犬の炎症性疾患における一元放射免疫拡散法を用いた 血清ハプトグロビン濃度測定の有用性

大 橋 英 二[†]

北海道 開業 (〒089-0535 中川郡幕別町札内桜町112-2)

(2005年10月14日受付・2006年2月28日受理)

要 約

ハプトグロビン (Hp) は、血清中の急性相蛋白の一つであり、その血清濃度の変化は炎症性疾患の病態把握に利用できる。犬の各種炎症性疾患における血清 Hp 濃度を市販のキットを使用して一元放射免疫拡散法で測定し、他の急性相蛋白である血清 α_1 -酸性糖蛋白 (α_1 -AG) 濃度と比較することでその臨床面における有用性について検討した。その結果、疾患犬の血清 Hp 濃度は、呼吸器、消化器および外傷性疾患等の各種急性炎症疾患で高値を示すものが多かった。また、血清 Hp と α_1 -AG 両濃度間に有意な正の相関が認められ、疾患犬では α_1 -AG よりも Hp の方が健康犬と比較して高値を示す症例が多かった。したがって、犬の種々の炎症性疾患時の診断および病勢の指標として、今回の一元放射免疫拡散法による Hp の測定は α_1 -AG と同等あるいはそれ以上に有用であると考えられた。

——キーワード：急性相蛋白、 α_1 -酸性糖蛋白、犬、ハプトグロビン、一元放射免疫拡散法。

日獣会誌 59, 473～477 (2006)

ハプトグロビン (Hp) は、血液中の急性相蛋白の一つである。急性相蛋白は種々の炎症、感染、組織損傷あるいは悪性腫瘍の際に、非特異的に血清中に増加する蛋白の総称であり、人医学において炎症性疾患の病態把握に広く利用されている [5]。急性相蛋白には、正の反応 (増加) を示すものに α_1 -酸性糖蛋白 (α_1 -AG)、 α_1 -アンチトリプシン、セルロプラスミン、Hp、 α_2 -マクログロブリン、フィブリノゲン、アミロイド A 蛋白 (SAA)、および C-反応性蛋白 (CRP)、負の反応を示すものにはアルブミンおよびトランスフェリンがあげられる [1, 9]。国内の小動物臨床現場で測定可能な急性相蛋白は、動物種特異性のほとんどないフィブリノゲンを除けば、犬の Hp、 α_1 -AG、CRP および猫の α_1 -AG である。そのうち、Hp 以外の急性相蛋白測定の臨床面における有用性を評価した報告は多く見られるが、Hp に関するものは比較的少ない [1, 4, 9, 10, 15-17, 19]。

血清 Hp 濃度測定法は分光光度法と免疫測定法に大別される。分光光度法は Hp のヘモグロビンとの結合能を利用した吸光度の変化に基づくものであり、免疫測定法は比濁分析法が用いられている [18]。そして両法ともヒト Hp の測定系を用いて犬 Hp を測定しその有効性が認められている。人の Hp は 3 つのサブタイプ (1-1,

2-1 および 2-2) に分類され、その中の Hp1-1 が犬 Hp に近い性状であるとされている [1]。しかし、犬 Hp にはヒト 1-1 Hp とは異なる蛋白構造部位が存在することと、抗ヒト Hp モノクローナル抗体は犬 Hp を認識しないことが報告されている [1]。現在、免疫測定法の一つである一元放射免疫拡散法を用いた犬 Hp 測定キットが市販されている。本キットは、抗犬 Hp 血清を使用しているために種特異性が高く、さらに特殊な器具機材を必要とせず微量の血清または血漿を用いて簡便に定量的な測定ができるため、臨床現場で容易に利用可能である。しかし、犬 Hp をこのキットを用いて測定し、有用性を検討した報告は認められない。

今回、犬の各種炎症性疾患における血清 Hp 濃度を市販のキットを用いて一元放射免疫拡散法で測定し、同法による血清 α_1 -AG 濃度と比較することでその臨床面における有用性について検討した。

材 料 お よ び 方 法

著者の動物病院に来院した犬 77 頭を対象とし、健康犬 22 頭および疾患犬 55 頭に分類した。健康犬は、健康診断あるいは去勢・避妊手術を目的に来院した臨床的に健康な雄犬 11 頭 (去勢済 5 頭含む) および雌 11 頭 (避

[†] 連絡責任者：大橋英二 (あかしや動物病院)

〒089-0535 中川郡幕別町札内桜町112-2 ☎・FAX 0155-21-5116

犬の炎症性疾患における血清ハプトグロビン濃度

図1 健康犬22頭の性別および年齢別の血清Hp（上段）および α_1 -AG濃度（下段）。
両濃度とも性別（*t*-検定）および年齢別（Bonferroni/Dunn法）に有意差は認められない。
エラーバーは標準偏差を示す。

妊手術済1頭含む）で、犬種は12種（雑種7、ビーグル3、ミニチュア・ダックスフンド2、ラブラドル・レトリバー2、ゴールデン・レトリバー1、フラットコーテッド・レトリバー1、シェットランド・シープドッグ1、柴1、チワワ1、ボーダー・コリー1、イングリッシュ・コッカスパニエル1、シーズー1頭）であった。年齢は0～1歳5頭、2～4歳10頭および5歳以上が7頭であった。疾患犬は雄31頭（去勢済8頭）、雌24頭（避妊手術済7頭）、犬種は18種（雑種19、シーズー6、ビーグル4、シベリアン・ハスキー4、柴3、マルチーズ3、ゴールデン・レトリバー2、秋田2、キャバリア・キングチャールズ・スパニエル2、ミニチュア・ダックスフンド2、およびラブラドル・レトリバー、土佐、シェットランド・シープドッグ、パグ、狆、パピヨン、ヨークシャー・テリア、ボストン・テリア各1頭）であった。疾患犬を、大西ら[14]の犬CRP測定に関する報告における疾患群分類に準じ、器官別の6群に分類した。すなわち、呼吸器疾患（ジステンパー4、気管支炎1、肺炎1、喉頭炎1頭）、消化器疾患（肝炎3、消化管内異物3、会陰ヘルニア2、胃腸炎2、急性胃拡張1、口腔内黒色腫1、肝臓血管肉腫1、パルボウイルス感染症1頭）、泌尿生殖器疾患（腎不全3、子宮蓄膿症2、セルト

図2 血清Hpおよび α_1 -AG濃度の相関関係（*n* = 77）。
両濃度間に有意な中程度の相関が認められる（*r* = 0.439, *P* < 0.0001）。
横点線および縦点線は、それぞれ血清Hpおよび α_1 -AG濃度の正常範囲上限を示す。

リ細胞腫2、胎仔死1、乳腺腫瘍1、前立腺炎1、子宮内膜炎1頭）、皮膚疾患（毛包上皮腫、皮脂腺腫、プレドニゾロン投与中の皮膚肥満細胞腫、膿皮症、アレルギー性皮膚炎および線維肉腫各1頭）、外科疾患（骨折2、脱臼1、打撲1、避妊手術2日後1頭）、その他（僧房弁閉鎖不全症2、癲癇2、副腎皮質機能亢進症2、全眼球炎1、糖尿病1、甲状腺癌1、角膜炎1、秋田犬のVogt・小柳・原田病様疾患1、熱中症1頭）であった。

採血は橈側皮静脈、伏在静脈あるいは頸静脈から行い、血清分離後測定まで -20°C で保存した。血清Hpおよび α_1 -AG濃度は、市販のキット^{a), b)}を用いて一元放射免疫拡散法で測定した。血清Hp濃度測定では、抗犬Hp血清を含む寒天平板の検体注入穴に、5倍希釈した5 μ lの血清または血漿と犬Hp濃度が0.25および1.00mg/mlの基準液を注入し、室温で24～48時間反応させた後、生じたそれぞれの沈降リング面積により測定値を得た。血清 α_1 -AG濃度測定もほぼ同様の手順で実施した。なお、各症例の血清Hpおよび α_1 -AG濃度測定値は、避妊手術2日後の症例以外は初診時の測定値を用い、同時に複数の疾患が併発している場合は主をなす症状と考えられる疾患群に分類した。

健康犬における雌雄間の血清Hpおよび α_1 -AG濃度の平均値の差の検定、および健康犬と全疾患犬間の両濃度の平均値の差の検定は対応のない*t*-検定を用いた。健康犬の年齢群間、および健康犬と各疾患群間の両濃度差の検定は、Bonferroni/Dunn法による多重比較検定を行った。また、血清Hpと α_1 -AG濃度に関してピアソ

a) イヌHpプレート、(株)メタボリックエコシステム研究所、宮城。

b) イヌ α_1 -AGプレート、(株)メタボリックエコシステム研究所、宮城。

図3 各疾患群別の血清Hp濃度。呼吸器 ($P < 0.0001$), 消化器 ($P = 0.0017$), および外科疾患群 ($P < 0.0001$) の血清Hp濃度が, 健康群に比較して有意に高値を示す。

*は健康群と有意差の認められた群, エラーバーは標準偏差を示す。

図4 各疾患群別の血清 α_1 -AG濃度。呼吸器疾患群 ($P = 0.0008$) および消化器疾患群 ($P = 0.0012$) の血清 α_1 -AG濃度が, 健康群に比較して有意に高値を示す。

*は健康群と有意差の認められた群, エラーバーは標準偏差を示す。

ンの積率相関係数を求め, その有意性の検定を行った。それぞれの検定結果は, t -検定と相関性は $P < 0.05$ を, Bonferroni/Dunn 法は $P < 0.0024$ を有意差ありとした。両濃度の正常範囲は, 健康犬の平均値 $\pm 2\text{SD}$ (標準偏差) とした。

成 績

健康犬の血清Hpおよび α_1 -AG濃度の正常範囲はそれぞれ $0 \sim 2.6\text{mg/ml}$ および $0 \sim 846\mu\text{g/ml}$ であった。健康犬22頭の血清Hp濃度は, 雌雄間および年齢群間に有意差は認められず, 同様に血清 α_1 -AG濃度においても有意差は認められなかった (図1)。健康犬22頭と全疾患犬55頭における血清Hp濃度の平均値の比較においては, 疾患犬 (平均値 $\pm \text{SD}$; $3.1 \pm 1.8\text{mg/ml}$) が健康犬 ($1.3 \pm 0.6\text{mg/ml}$) よりも有意 ($P < 0.0001$) に高値を示し, 血清 α_1 -AG濃度においても疾患犬 ($691 \pm 575\mu\text{g/ml}$) が健康犬 ($287 \pm 280\mu\text{g/ml}$) よりも有意 ($P = 0.0024$) に高値であった。健康犬と疾患犬の全測定値 ($n = 77$) における血清Hpおよび α_1 -AG濃度間には, 有意な中程度の正の相関が認められた。疾患犬中, 両濃度とも正常範囲よりも高値を示した例は13頭であり, 特に高値を示した疾患名は, 気管支炎 (Hp; 7.3mg/ml , α_1 -AG; $1,600\mu\text{g/ml}$), 避妊手術2日後 (Hp; 5.6mg/ml , α_1 -AG; $1,860\mu\text{g/ml}$), 肝炎 (Hp; 4.6mg/ml , α_1 -AG; $2,880\mu\text{g/ml}$) および肺炎 (Hp; 4.2mg/ml , α_1 -AG; $2,050\mu\text{g/ml}$) であった。なお, この肝炎症例は, 発熱と黄疸を伴う急性疾患であった。両濃度とも正常範囲内であった例が20頭で, 特に低値を示した疾患名は, 腎不全 (慢性腎不全, Hp; 0.5mg/ml , α_1 -AG; $310\mu\text{g/ml}$), 子宮内膜炎

(Hp; 0.6mg/ml , α_1 -AG; $80\mu\text{g/ml}$), 癲癇 (Hp; 0.6mg/ml , α_1 -AG; $180\mu\text{g/ml}$) および角膜炎 (Hp; 1.1mg/ml , α_1 -AG; $0\mu\text{g/ml}$) であった。血清Hp濃度は高値を示し α_1 -AG濃度が正常範囲内であった例が17頭で, Hpが特に高値であった病名は, 骨折 (Hp; 6.7mg/ml , α_1 -AG; $400\mu\text{g/ml}$), 皮膚肥満細胞腫 (Hp; 6.7mg/ml , α_1 -AG; $500\mu\text{g/ml}$) および肩関節脱臼 (Hp; 6.5mg/ml , α_1 -AG; $420\mu\text{g/ml}$) であった。血清Hp濃度は正常範囲内で α_1 -AG濃度が高値を示した例が5頭であり, α_1 -AG濃度が特に高値を示した例は, 甲状腺癌 (Hp; 2.5mg/ml , α_1 -AG; $1,880\mu\text{g/ml}$) であった (図2)。

各疾患群別の血清Hpおよび α_1 -AG濃度を, それぞれ図3および4に示す。Hpの平均値は, 6疾患群とも健康犬群に比較して高く, 呼吸器 ($P < 0.0001$), 消化器 ($P = 0.0017$) および外科 ($P < 0.0001$) 疾患群において有意差が認められた。 α_1 -AGにおいても, 6疾患群の平均値は健康犬群に比較して高く, 呼吸器 ($P = 0.0008$) および消化器 ($P = 0.0012$) 疾患群では有意差が認められた。両濃度ともに健康犬群と有意差が認められなかった3群においては, 泌尿生殖器疾患群 (Hp; $P = 0.0047$, α_1 -AG; $P = 0.5736$), 皮膚疾患群 (Hp; $P = 0.0730$, α_1 -AG; $P = 0.5229$) およびその他疾患群 (Hp; $P = 0.0234$, α_1 -AG; $P = 0.0444$) の P 値は, Hpの方が α_1 -AGの場合と比較して低値を示す傾向がみられた。

考 察

健康および各種疾患犬における血清Hp濃度に関する報告のほとんどは, その測定に分光光度法が用いられている。今回の一元放射免疫拡散法による健康犬のHpおよび α_1 -AGはそれぞれ $1.3 \pm 0.6\text{mg/ml}$ および $287 \pm$

280 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり, Martinez-Subiela ら [10] の分光光度法による健康犬の Hp は $1.95 \pm 0.42 \text{mg}/\text{ml}$, Ohwada ら [14] の一元放射免疫拡散法による α_1 -AG は $302 \pm 74 \mu\text{g}/\text{ml}$ と, 今回の測定値とほぼ同レベルであった. 今回の研究では, 疾患犬の一元放射免疫拡散法を用いた Hp が α_1 -AG と同様に健康犬よりも有意に高値を示し, さらに両濃度間に有意な相関が認められた. 犬の α_1 -AG は炎症時に高値を示す事が, すでに多くの報告 [3, 8, 19] で明らかとなっている. したがって, 今回の犬 Hp 測定キットを用いた Hp の測定結果は, 従来の分光光度法同様に評価可能であると考えられた.

Solter ら [16] の報告では, 犬の炎症時に Hp とセルロプラスミンが増加し, 両者ともに総白血球数およびフィブリノゲンと正の相関が認められたとしている. Tecles ら [17] は, 急性炎症, 造血管腫瘍, 非造血管腫瘍, 自己免疫性溶血性貧血罹患犬の4疾患群および健康犬での, 血清 Hp, セルロプラスミン, SAA および CRP 濃度を測定した. その結果, 有意に高値を示したものは, Hp では急性炎症と造血管腫瘍, セルロプラスミンは急性炎症と自己免疫性溶血性貧血, CRP は急性炎症, 造血管腫瘍および自己免疫性溶血性貧血であるなど, 急性炎症以外では急性相蛋白の種類によって相違が認められた. 今回の研究では, Hp はすべての疾患群の平均値が健康犬群よりも高かったが, 有意差の認められたものは呼吸器, 消化器および外科疾患群であった. これらの疾患群は, 発熱, 疼痛等の全身性の急性炎症を伴う疾患を多く含み, Tecles ら [17] の報告に類似した. これに対して, α_1 -AG では外科疾患群に健康群との有意差が認められなかった. また, Hp が特に高値で α_1 -AG が正常範囲内であった例に外科疾患群の骨折と肩関節脱臼が含まれた. 犬では外因性あるいは内因性グルココルチコイドが Hp 分泌を増加させることが報告されている. このことに関して, McGrotty ら [11, 12] の報告では, 副腎皮質機能亢進症の犬の診断時に高値であった Hp が, トリロスタンによる治療後有意に低下し, さらに Hp は副腎皮質ホルモン製剤を投与した疾患群で特に高値を示した. 今回の外科疾患群では, 疼痛あるいは外科的侵襲に起因する内因性副腎皮質ホルモンの分泌亢進が生じたことで, Hp 分泌がさらに亢進されたことが, Hp のみに有意差が認められた要因の一つと推察された. また, 両濃度ともに特に低値を示した疾患は, 慢性腎不全, 子宮内膜炎, 癲癇および角膜炎であり, これらは非炎症性疾患および限局性または慢性炎症性疾患であった.

大西ら [15] の各種疾患犬における CRP 測定の報告でも同様の成績が得られている. Martinez-Subiela ら [10] は, 犬のリーシュマニア症の感染時に, CRP とセルロプラスミンは発症犬においてのみ増加したのに対し

て Hp は不顕性感染犬においても増加したとしている. McGrotty ら [11] は, Hp は多くの疾患で増加するために特異性は低いとしている. 今回の研究では, Hp および α_1 -AG とともに健康群と有意差の認められなかった3疾患群では, 両濃度ともに平均値は健康群よりも高かったが, P 値は Hp が α_1 -AG と比較して低値傾向を示した. これらの結果から, 今回の一元放射免疫拡散法による Hp の測定は α_1 -AG と同等あるいはそれ以上に炎症マーカーとして有用であると思われる.

急性相蛋白の非特異性ゆえにその測定のみでは個々の疾患の診断を行うことは不可能である. しかし, 本研究の結果から, たとえば犬が健康であるか否かの鑑別, あるいは疾患犬の治療経過をみるためのモニタリングに特に有効であると考えられた. 今回使用した犬 Hp 測定キットは, その簡便さによりほとんどの臨床現場で使用可能であるため, 一般診療時の血液検査項目の一つに Hp を加えることで診断精度の向上が見込まれると思われる.

健康な人の血清 Hp, α_1 -AG および健康犬の α_1 -AG 濃度は, 新生児 (仔) が低値である事を除けば性差および年齢差はないとされている [1, 3, 5] が, 犬の血清 Hp 濃度に関しては明らかではない. 本研究の結果においては, 健康犬の血清 α_1 -AG 濃度のみならず Hp 濃度においても性差および年齢差は少ないと考えられた. 犬の新生仔の血清 Hp 濃度については, 今回測定を行わなかったために明らかにできなかったが, Hp は α_1 -AG 同様にその多くが肝臓で生成される血清蛋白である [5] ため, 低値である事が推察される.

人における Hp, α_1 -AG あるいは CRP 等の急性相蛋白の合成・分泌機構はほぼ同様に考えられている. 簡潔には, 単球あるいはマクロファージが炎症時に活性化することでインターロイキン 1 (IL-1), IL-6, 腫瘍壊死因子 (TNF) 等のサイトカインを合成・分泌し, これらが相互に関連しながら肝細胞での急性相蛋白の合成・分泌を誘導する [1, 5, 18]. しかし, これらサイトカインと急性相蛋白の血中における増加の速さや持続時間は疾患・炎症の種類, 強さ, あるいは動物種によって異なる [2, 7]. たとえばラットの熱傷下における研究 [6] では, IL-1 は3日間増加し続け, IL-6 は1時間後にすでに増加し1日目ピークであった. また, TNF, Hp および α_2 -マクログロブリンは12時間後に増加し, TNF と Hp 間に正の相関が認められた. 乳牛の重度大腸菌性乳房炎においては, IL-1 と TNF が観察期間中持続的に増加していたのに対して, α_1 -AG は次第に増加し始めて9日目にピークとなり, Hp は3日目にピークとなつてから次第に減少した [13]. また, Hp はヘモグロビンと特異的に結合する糖蛋白質で遊離型ヘモグロビンの毒性中和と腎からの喪失防止という機能と, 炎症に対する

急性相蛋白という側面を合わせ持つ。他方、 α_1 -AGは免疫応答に対する抑制作用とプロゲステロンと結合し失活させる作用が知られている [5]。犬におけるHpとその他の急性相蛋白の炎症時の動態あるいは機能の相違に関しては、症例の蓄積に加えて、犬のCRPあるいはIL-6等の他の急性相蛋白およびサイトカインの変動を検討する事により明らかになってくると考えられた。

引用文献

- [1] Ceron JJ, Eckersall PD, Martinez-Subiela S : Vet Clin Pathol, 34, 85-99 (2005)
- [2] Gruys E, Obwolo MJ, Toussaint MJM : Vet Bull, 64, 1009-1018 (1994)
- [3] Hayashi S, Jinbo T, Iguchi K, Shimizu M, Shimada T, Nomura M, Ishida Y, Yamamoto S : Vet Res Commun, 25, 117-126 (2001)
- [4] Kajikawa T, Furuta A, Onishi T, Tajima T, Sugii S : Vet Immunol Immunopathol, 29, 91-98 (1999)
- [5] 亀崎豊実, 梶井英治: 内科, 93, 1052 (2004)
- [6] Kataranovski M, Magic Z, Pejnovic N : Physiol Res, 48, 473-482 (1999)
- [7] Kent J : Br Vet J, 148, 279-282 (1992)
- [8] Kuribayashi T, Shimizu M, Shimada T, Honjyo T, Yamamoto Y, Kuba K, Yamamoto S : Exp Anim, 52, 377-381 (2003)
- [9] Martinez-Subiela S, Tecles F, Eckersall PD, Ceron JJ : Vet J, 166, 233-237 (2003)
- [10] Martinez-Subiela S, Tecles F, Eckersall PD, Ceron JJ : Vet Rec, 150, 241-244 (2002)
- [11] McGrotty YL, Arteaga A, Knottenbelt CM, Ramsey IK, Eckersall PD : Vet Clin Pathol, 34, 255-258 (2005)
- [12] McGrotty YL, Knottenbelt CM, Ramsey IK, Reid SW, Eckersall PD : Vet Rec, 152, 562-564 (2003)
- [13] Ohtsuka H, Kudo K, Mori K, Nagai F, Hatsugawa A, Tajima M, Tamura K, Hoshi F, Koiwa M, Kawamura S : J Vet Med Sci, 63, 675-678 (2001)
- [14] Ohwada K, Tamura K : Exp Anim, 42, 627-630 (1995)
- [15] 大西堂文, 猪熊 壽, 大野耕一, 添田晋吾, 野口主宏, 佐々木主計 : 日獣会誌, 53, 595-601 (2000)
- [16] Solter PF, Hoffmann WE, Hungerford LL, Siegel JP, St Denis SH, Dorner JL : Am J Vet Res, 52, 1738-1742 (1991)
- [17] Tecles F, Spiranelli E, Bonfanti U, Ceron JJ, Paltrinieri S : J Vet Intern Med, 19, 865-870 (2005)
- [18] Weidmeyer CE, Solter PF : Vet Clin Pathol, 25, 141-146 (1996)
- [19] Yamashita K, Fujinaga T, Miyamoto T, Hagio M, Izumisawa Y, Kotani T : J Vet Med Sci, 56, 487-492 (1994)

Utility of Serum Haptoglobin Concentration Using Single Radial Immunodiffusion in Dogs with Inflammation

Eiji OHASHI[†]

Akashiya Animal Hospital, 112-2 Sakura-machi, Satsunai, Makubetsu-cho, Nakagawa-gun, 089-0535

SUMMARY

Haptoglobin (Hp) has been used to evaluate conditions of inflammatory diseases as one of serum acute phase proteins. In this study, serum Hp concentrations in dogs with different types of inflammation were measured with single radial immunodiffusion using a commercial kit, and compared with serum α_1 -acid glycoprotein (α_1 -AG) concentrations. Concentrations of serum Hp in acute inflammatory diseases such as respiratory and digestive system diseases and traumas were significantly higher than those in healthy dogs, and a positive correlation was found between serum Hp and serum α_1 -AG. Moreover, The differences of Hp concentrations between healthy and diseased dogs were larger than those of α_1 -AG. It was therefore concluded that measurement of serum Hp concentration with single radial immunodiffusion could be a useful tool in clinical practice, equal to or better than measurement of α_1 -AG, for diagnosing or monitoring inflammation in a variety of disease conditions in dogs.

— Key words : acute phase protein, α_1 -acid glycoprotein, dog, haptoglobin, single radial immunodiffusion.

[†] Correspondence to : Eiji OHASHI (Akashiya Animal Hospital)

112-2 Sakura-machi, Satsunai, Makubetsu-cho, Nakagawa-gun, 089-0535

TEL · FAX 0155-21-5116

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 59, 473 ~ 477 (2006)