Original Article (原著論文)

野生オナガガモ (*Anas acuta*) における血漿
総タンパクの測定法および参考値

村田 浩一*・萩原 未央*・杉森 文夫**

Comparison of Some Methods for Determining Total Protein
Concentrations in the Plasma of Wild Pintails (*Anas acuta*)
and its Reference Value

Koichi Murata*, Mio Hagihara* and Fumio Sugimori**

Abstract. Several methods for determination of total protein (TP) concentrations in the plasma of Pintail (*Anas acuta*) captured in winter in Japan were compared. TP values determined using wet and dry chemistry analyses of biuret methods were 3.51 ± 0.35 g/dL and 3.49 ± 0.35 g/dL (mean $\pm$ SD), respectively. The correlation between TP values determined by these two analyses was significant ($p < 0.001$, $r = 0.9763$). These data can serve a reference value of the species in this season. The TP value determined by refractometry was 3.86 ± 0.45 g/dL and was about 10% higher than those obtained through wet or dry chemistry analyses. Correlations of refractometric values with those determined by wet and dry chemistry analyses were significant ($p < 0.001$, $r = 0.9414$ and $p < 0.001$, $r = 0.9251$, respectively). TP values obtained by refractometry could be converted to those obtained through wet chemistry analyses by the following equation:

$$y \text{ (g/dL)} = 0.738x \text{ (g/dL)} + 0.659$$

x = plasma TP values determined by refractometry

y = converted plasma TP values from refractometry to wet chemistry.

Key words: Blood chemistry, Pintail *Anas acuta*, Plasma total protein, Refractometry.

キーワード: 血液生化学, オナガガモ *Anas acuta*, 血漿総タンパク, 屈折計.

はじめに

哺乳類と同様に鳥類においても、個体の全身状態を知る上で血液生化学検査における血清もしくは血漿総タンパク値は重要な指標となっている (Hochleithner 1994, Fudge 1996)。とくに細菌やウィルスに感染した場合は、血漿総タンパク中の免疫グロブリン値が高くなる場合が多

Received 3 June 2003, Revised 16 September 2003, Accepted 17 December 2003.

* 日本大学生物資源科学部野生動物学研究室, 〒252-8510 神奈川県藤沢市亀井野 1866.

** (財)山階鳥類研究所, 〒270-1145 千葉県我孫子市高野山 115.

* Department of Wildlife Science, College of Bioresource Sciences, Nihon University, 1866 Kameino, Fujisawa, Kanagawa 252-8510, Japan.

** Yamashina Institute for Ornithology, 115 Konoyama, Abiko, Chiba 270-1145, Japan.

いため、各種感染症診断の有用な検査項目とされている (Ahmed *et al.* 1974, Rivets *et al.* 1977, Campbell 1986)。また重金属暴露によっても変動することが報告されている (Hoffman *et al.* 2000)。

動物臨床分野で血清もしくは血漿総タンパク測定のために用いられている方法には、ビウレット法に基づく液体試薬を用いた生化学分析法 (以下ウェットケミストリー法)、乾式血液生化学分析法 (以下ドライケミストリー法) および屈折率からタンパク濃度を推定する屈折計を用いた方法がある。とくに屈折計による方法は簡便・迅速で装置が安価であり、測定試料が微量ですむため家畜に対しては多用されている (Kaneko 1997)。しかし、レースバト (*Columba livia* var. *domestica*) やその他の鳥類には、屈折計によるタンパク測定が不適切であるという報告 (Coles 1985, Lumeij & Bruijne 1985, Lumeij *et al.* 1990, Hochleithner 1994) がある一方で、ニワトリ (*Gallus gallus* var. *domesticus*) には有効であるという報告 (Andreasen *et al.* 1989) もあり、屈折計の利用についての評価は定まっておらず、種ごとに再検討していく必要がある。

筆者らは、重金属等の環境汚染が鳥類に与える影響を研究するため、オナガガモ (*Anas acuta*) を対象とした各種生体データの収集を試みている。その一環として、捕獲個体群の健康モニタリングを目的とした血液生化学検査を行っているが、血液生化学検査値の中でも血漿総タンパクと、それから求められるアルブミン/グロブリン比 (A/G 比) が個体の健康状態を知る上で有効な指標になると考えている。そこで、血液生化学分析装置を用いた血漿総タンパク測定と屈折計の有用性について検討し、オナガガモにおける血漿総タンパクの参考値を求めた。

方 法

1) 血液試料

測定に供した血漿は、2002年12月と2月に環境省の許可を得て宮内省越谷鴨場で捕獲したオナガガモの成鳥48個体 (12月: 雄13, 雌16, 2月: 雄11, 雌8) から採取した。全個体とも外見から健康であると判断した。採血は用手保定下で翼下静脈から行い、抗凝固剤にはヘパリン-Naを用いた。採血は午後1時から2時の間に行った。血液は冷却箱内 (5℃) に入れて研究機関まで輸送し、採血から約3時間後に遠心機 (3,000 rpm, 5分間) で血漿を分離し、測定に供するまで凍結保存 (-80℃) した。測定時には室温で解凍した。

2) 測定法

ウェットケミストリー法による測定には、7170型自動分析装置 (日立製作所) を用いた。試薬には総蛋白 II-HA テストワコー (和光純薬工業) を用いた。ドライケミストリー法による測定に用いた装置は、富士ドライケム FDC-5500 (富士写真フイルム) で、多層フィルムを用いた比色終点法と比色速度法を測定方式としている。

屈折計はアタゴ社製の血清蛋白屈折計 (SPR-NE) を用い、測定は室温下 (約20℃) で実施した。毎回の測定前後に蒸留水で目盛補正を行った。

3) 統計学的検討

測定値の雌雄差および採血月 (12月と2月) における差の有無を Student's *t*-test で検定した。

Table 1. Total protein (TP) values from plasma samples of male and female Pintails by wet chemistry, dry chemistry and refractometry analysis. The differences of TP values between the two sexes in each month, and within each sex during two sampling months were not significant ($p > 0.05$). TP values are shown as mean $\pm$ SD (ranges). The total number of samples (48) comprised 13 males and 16 females in December, and 11 males and 8 females in February.

Sex	Methods	TP values (g/dL) and month of sampling	
		December	February
Male	wet chemistry	3.44 $\pm$ 0.36 (2.88–4.27)	3.43 $\pm$ 0.32 (3.11–3.92)
	dry chemistry	3.39 $\pm$ 0.36 (2.80–4.20)	3.43 $\pm$ 0.32 (3.00–3.90)
	refractometry	3.78 $\pm$ 0.51 (3.00–5.00)	3.82 $\pm$ 0.38 (3.20–4.40)
Female	wet chemistry	3.55 $\pm$ 0.42 (2.83–4.36)	3.63 $\pm$ 0.25 (3.15–3.85)
	dry chemistry	3.53 $\pm$ 0.41 (2.90–4.20)	3.66 $\pm$ 0.23 (3.20–3.90)
	refractometry	3.89 $\pm$ 0.50 (3.20–5.00)	3.96 $\pm$ 0.39 (3.20–4.40)
Male + Female	wet chemistry	3.50 $\pm$ 0.39 (2.83–4.36)	3.51 $\pm$ 0.30 (3.11–3.92)
	dry chemistry	3.47 $\pm$ 0.39 (2.80–4.20)	3.53 $\pm$ 0.31 (3.00–3.90)
	refractometry	3.84 $\pm$ 0.50 (3.00–5.00)	3.88 $\pm$ 0.38 (3.20–4.40)
Male + Female	wet chemistry	3.51 $\pm$ 0.35 (2.83–4.36)	
	dry chemistry	3.49 $\pm$ 0.35 (2.80–4.20)	
	refractometry	3.86 $\pm$ 0.45 (3.00–5.00)	

3 法によって得られた各測定値を相関分析した。

結 果

ウェットケミストリー法およびドライケミストリー法を用いた血漿総タンパク測定値に、雌雄および採血月による統計的な有意差を認めなかった ($p > 0.05$) (Table 1)。全試料の平均値 (±標準偏差, 以下同) は、それぞれ 3.51 $\pm$ 0.35 g/dL と 3.49 $\pm$ 0.35 g/dL であり、2 法による測定値間には有意な相関が認められた ($p < 0.001$, $r = 0.9763$) (Fig. 1)。

屈折計による測定値は 3.86 $\pm$ 0.45 g/dL で、他の 2 法で求められた値に比べると 10.3–10.6% ほど高値を示した。

屈折計による測定値とウェットケミストリー法もしくはドライケミストリー法による測定値間には有意な相関が認められた ($p < 0.001$, $r = 0.9414$ および $p < 0.001$, $r = 0.9251$) (Fig. 2)。

屈折計による測定値をウェットケミストリー法による測定値に換算するために以下の式が求められた。

$$y = 0.738x + 0.659$$

ただし、 x は屈折計による測定値、 y はウェットケミストリー法による測定値を示す。

論 議

これまで、ガンカモ目の血液生化学分析値については数多く報告されている (Rozman *et al.* 1974, Kokan & Pitts 1976, Mori & George 1978, Fairbrother *et al.* 1990, Hoffman *et al.* 2000)。しかし、オナガガモ野生個体群を対象とした報告は知る限りない。今回、ウェットケミストリー法およびドライケミストリー法で得られた血漿総タンパク測定値 (3.51 $\pm$ 0.35 g/dL と 3.49 $\pm$ 0.35 g/dL) は、冬季における本種の参考値になると考えた (Table 1)。採血時期や健康状態など

Fig. 1. The correlation between plasma total protein values obtained through wet chemistry and dry chemistry analyses. A significant relationship ($p < 0.001$, $r = 0.9763$) was observed. The regression line is shown.

Fig. 2. The correlation between plasma total protein values obtained through refractometry and wet chemistry analysis. The refractometry value was slightly higher than that obtained through wet chemistry analysis, but the relationship was significant ($p < 0.001$, $r = 0.9414$). The regression line is shown.

が記されていないので単純に比較検討できないが、今回得られた測定値はアメリカオシ (*Aix sponsa*) の値 (3.4–5.4 g/dL), カナダガン (*Branta canadensis*) の値 (3.73–5.63 g/dL), ハクチョウ (*Cygnus* sp.) の値 (3.55–5.45 g/dL) と比べて同等もしくはやや低い値であった (Mori & George 1978, Lumeij 1996)。北米のオオホシハジロ (*Aythya valisineria*) では、11月から翌年の1月にかけて血漿総タンパク値が高く、その後やや低下する傾向が認められている (Kokan & Pitts 1976)。カナダガン (*Branta canadensis interior*) では、渡り前の3月に最高値を示した後、換羽期の8月頃に最低値を示すことが知られている (Mori & George 1978)。非繁殖期に採血されたマガモ (*Anas platyrhynchos*) では、雄が 3.8 ± 0.7 g/dL, 雌が 4.2 ± 0.5 g/dL であるが、繁殖期には上昇し、換羽期になると下降する傾向が認められている (Fairbrother *et al.* 1990)。このようにガンカモ目では、血液生化学値が繁殖や渡りの時季によって変動することがあるため、健康モニタリングを目的として測定値を評価する際には、性別・齢別・採血時刻などとともに採血時季を考慮に入れる必要がある (Kokan & Pitts 1976, Fairbrother *et al.* 1990)。本例の血漿総タンパクが既報と比べ低値であったことは、測定方法の違い以外に渡りによる消耗が原因とも考えられるが、このことを確認するには1年を通した血液検査を同法で行い、測定値を比較検討する必要がある。

ヒト医療分野の血漿総タンパク測定のために、従来からアルカリ中で銅イオンがタンパクとキレート結合する際の呈色反応を利用したビウレット法が用いられている。測定にはウエットケミストリー血液生化学分析装置が検査機関等で主に使用されているが、動物病院等の小規模検査室ではドライケミストリー血液生化学分析装置が普及している。今回、オナガガモの血漿タンパク測定においてウエットケミストリー法とドライケミストリー法による測定値間には有意な相関が認められた ($p < 0.001$)。このことは、小規模検査室または野外調査地でも、小型で運搬可能なドライケミストリー血液生化学分析装置を用いて大規模検査機関と同様の血漿総タンパク測定がその場でできることを示唆している。ただし、今回得られた測定値は比較的低値であったため、今後はより高値の試料を含めた場合の相関について再検討が必要であろう。

血清もしくは血漿総タンパク測定のための屈折計は、他の血液生化学分析装置と比べるとはるかに安価であり、測定法も簡便であるため家畜臨床分野で繁用されてきた (Andreasen *et al.* 1989, Kaneko 1997)。とくに微量試料でも測定できるため、採血量が限られる小動物や鳥類の臨床診断には有用である。一方、レースバトでは屈折計による測定値がウエットケミストリー法による値より20%以上も高くなるため、鳥類の検査には適さないとの指摘がある (Lumeij & Bruijne 1985, Lumeij & Overduin 1990)。今回の屈折計による血漿総タンパク測定でも、ウエットケミストリー法もしくはドライケミストリー法による測定値と比較すると10%ほど高値を示す傾向が認められた。ニワトリやシチメンチョウ (*Meleagris gallopavo*) では、血清に比べてフィブリンの含まれる血漿でより高くなる傾向が認められている (Andreasen *et al.* 1989)。総タンパク測定には血清の利用が適していると考えられるが、血清分離に必要な静置の間に血糖、カリウムなどの測定値が代謝により低下する (Verstappen *et al.* 2002)。また、フィブリンは炎症性疾患の指標物質であるため、鳥類では血清よりも血漿を利用することが推奨されている (Andreasen *et al.* 1989)。屈折計で高い値を示す原因としては他に高血糖の影響も考えられているが、測定試料に糖を加えた実験では、わずかな上昇しか認められていない (McSherry & Al-Baker 1976)。鳥類血漿では屈折計による測定値がウエットケミストリー法およびドライケミス

トリー法よりも高値を示すことを考慮し、当該種の対象試料を用いてウェットケミストリー法およびドライケミストリー法による測定値への換算式をあらかじめ算出しておくことが妥当である。オナガガモでは、 $y=0.738x+0.659$ ($r=0.9414$, $n=48$) の換算式が有効であると考えられる。

ビウレット法による総タンパク測定では、血漿中の脂質や色素の存在による検査試料の混濁が分析の阻害要因となり測定結果に影響を与えることが指摘されている (Andreasen *et al.* 1989)。同様の問題は屈折計の測定時にも発生する (Lewandowski *et al.* 1986, Fudge 1997, Kaneko 1997)。冬季に渡りをするカモ類は、皮下や腹腔内に脂肪が蓄積されるため血液中の脂質が高くなる (Kokan & Pitts 1976, Mori & George 1978)。今回は北方から日本へ渡来した後の12月と2月に採血したが、血漿に肉眼的な乳糜は認められず中性脂肪および総コレステロール値もとくに異常値を示していなかった (村田 未発表)。哺乳類で屈折計測定値に影響が認められたのは、血清中に 700 mg/dL 以上の脂質が含まれている高脂血症例である (Hochleithner 1994)。今回の試料ではそれに比べてはるかに低値であったため、測定に与えた影響はほとんどないと考えた。だが、屈折計を用いて血漿タンパク値を測定する際にはとくに、先述したように採血の時季に十分配慮する必要がある。

環境変化や悪化が鳥類に与える影響を調査する上で、個体もしくは個体群の健康状態を把握しておくことは大切である (Kokan & Pitts 1976)。健康モニタリングの際には、血液学および血液生化学的検査による測定値が有用な指標となる。これまで、国内においては野鳥の個体群を対象とした血液検査はほとんど行われてこなかったが、今後は環境影響調査や野生動物保護管理のため各種獣医学的検査法の積極的な導入が望まれる。

謝 辞

オナガガモの捕獲および採血に協力していただいた宮内省越谷鴨場の職員の皆様ならびに研究班員の皆様に謝意を表します。また、血液生化学分析に協力していただいた富士フィルムメディカル西日本株式会社の寺田昭子氏、富士フィルムメディカル株式会社東京営業所の得平真子氏、同営業本部の寺川和秀氏に感謝いたします。本研究は、平成 14 年度文部科学省科学研究費 (特定奨励費)「希少鳥類の生存と回復に関する研究」によって実施された。

摘 要

野生オナガガモ (*Anas acuta*) の血漿総タンパク測定法について比較検討した。ビウレット法に基づくウェットケミストリー法およびドライケミストリー法による血漿総タンパク測定値 (平均±標準偏差, 以下同) は、それぞれ 3.51 ± 0.35 g/dL と 3.49 ± 0.35 g/dL であり、2 法による測定値間には有意な相関が認められ ($p < 0.001$, $r = 0.9763$)、この測定値が本種の冬季における参考値になると考えた。屈折計による測定値は 3.86 ± 0.45 g/dL で、他の 2 法で求められた値に比べると 10% ほど高値を示した。屈折計とウェットケミストリー法もしくはドライケミストリー法による測定値間にはそれぞれ有意な相関が認められた ($p < 0.001$, $r = 0.9414$ および $p < 0.001$, $r = 0.9251$)。屈折計測定値からウェットケミストリー分析法の測定値は、以下の換算式より求められた。

$$y \text{ (g/dL)} = 0.738x \text{ (g/dL)} + 0.659$$

ただし、 x は屈折計による測定値、 y はウェットケミストリー法による測定値。

引用文献

- Ahmed, A. A. S., El-Abdin, Y. Z. & Saad, F. E. 1974. Effect on experimental duck virus hepatitis infection on some biochemical constituents and enzymes in the serum of white Peking ducklings. *Avian Diseases* **19**: 305-310.
- Andreasen, C. B., Latimer, K. S., Kircher, I. M. & Brown, J. 1989. Determination of chicken and turkey plasma and serum protein concentrations by refractometry and the biuret method. *Avian Diseases* **33**: 93-96.
- Campbell, T. W. 1986. Selected blood biochemical tests used to detect the presence of hepatic disease in birds. *Proceedings of the Association of Avian Veterinarians*: 43-51.
- Coles, B. H. 1985. *Avian Medicine and Surgery* 2nd ed. Blackwell Science Ltd., Oxford.
- Fairbrother, A., Craig, M. A., Walker, K. & O'Loughlin, D. 1990. Changes in mallard (*Anas platyrhynchos*) serum chemistry due to age, sex and reproductive condition. *Journal of Wildlife Diseases* **26**: 67-77.
- Fudge, A. M. 1996. Avian clinical biochemistry. In *Diseases of Cage and Aviary Birds* 3rd ed. (eds. W. J. Rosskopf & R. W. Woerpel), pp. 773-782. Williams & Wilkins, Maryland.
- Fudge, A. M. 1997. Avian clinical pathology—Hematology and chemistry. In *Avian Medicine and Surgery* (eds. R. B. Altman, S. L. Clubb, G. M. Dorrestein & K. Quesenberry), pp. 142-157. W. B. Saunders Company, Philadelphia.
- Hochleithner, M. H. 1994. Biochemistries. In *Avian Medicine: Principles and Application* (eds. B. W. Ritchie, G. J. Harrison & L. R. Harrison), pp. 223-245. Winger Publishing Inc., Florida.
- Hoffman, D. J., Heinz, G. H., Sileo, L., Audet, D. J., Campbell, J. K., LeCaptain, L. J. & Obrecht, H. H. 2000. Development toxicity of lead-contaminated sediment in Canada geese (*Branta canadensis*). *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* **59**: 235-252.
- Kaneko, J. J. 1997. Serum proteins and the dysproteinemias. In *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* (eds. J. J. Kaneko, J. W. Harvey & M. L. Bruss), pp. 117-138. Academic Press, California.
- Kokan, R. M. & Pitts, S. M. 1976. Blood values of the canvasback duck by age, sex and season. *Journal of Wildlife Diseases* **12**: 341-346.
- Lewandowski, A. H., Campbell, T. W. & Harrison, G. J. 1986. Clinical chemistries. In *Clinical Avian Medicine and Surgery* (eds. G. J. Harrison & L. R. Harrison), pp. 192-200. W. B. Saunders Company, Philadelphia.
- Lumeij, J. T. 1996. Biochemistry and sampling. In *Manual of Raptors, Pigeons and Waterfowl* (eds. P. H. Beynon, N. A. Forbes & N. H. Harcourt-Brown), pp. 63-67. BSAVA, London.
- Lumeij, J. T. & Bruijine, J. J. 1985. Evaluation of the refractometric method for the determination of total protein in avian plasma or serum. *Avian Pathology* **14**: 441-444.
- Lumeij, J. T., Bruijine, J. J. & Kwant, M. M. 1990. Comparison of different methods of measuring protein and albumin in pigeon sera. *Avian Pathology* **19**: 255-261.
- Lumeij, J. T. & Overduin, L. M. 1990. Plasma chemistry references values in psittaciformes. *Avian Pathology* **19**: 235-244.
- McSherry, B. J. & Al-Baker, J. 1976. Comparison of total serum protein determined by T/S meter and biuret technique. *Bulletin of American Society of Veterinary Clinical Pathology* **5**: 4-12.
- Mori, J. G. & George, J. C. 1978. Seasonal changes in serum levels of certain metabolites, uric acid and calcium in the migratory Canada goose (*Branta canadensis interior*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* **59**: 263-269.
- Rivet, B., Bogin, E., Hornstein, K. & Merdinger, M. 1977. Biochemical changes in fowl serum during infection with strains of Newcastle diseases virus of differing virulence. Changes in serum proteins, uric acid, lipids and electrolytes, *Research in Veterinary Science* **22**: 285-291.
- Rozman, R. S., Locke, L. N. & McClure, S. 1974. Enzyme changes in mallard ducks fed iron or lead shot. *Avian Diseases* **18**: 435-445.
- Verstappen, F. A. L. M., Lumeij, J. T. & Bronneberg, R. G. G. 2002. Plasma chemistry reference value in ostriches. *Journal of Wildlife Diseases* **38**: 154-159.