

血漿フィブリノゲン簡易測定法のウシ及び イヌへの実用性について

林 隆敏*・沢 耕司*・浜本国治*・渡辺大直*・山根乙彦*

昭和 56 年 8 月 1 日受付

Determination of Blood plasma Fibrinogen by Heat Precipitation Method in Cattle and Dogs.

Takatoshi HAYASHI*, Koji SAWA*, Kuniji HAMAMOTO*,
Hironao WATANABE*, and Otohiko YAMANE*

The heat precipitation method described by Millar et al. was found to be correlated significantly with the tyrosine method in the estimation of blood plasma fibrinogen levels. The former was highly reproducible and available to estimate the blood plasma fibrinogen levels in cattle and dogs, and might be applicable to the veterinary practice because of the simplified method rather than salting-out and nephelometry or the tyrosine method.

緒 言

血液学では、従来炎症の状態及び病勢の判定に白血球数並びに白血球百分比が利用されている。しかし、牛の急性局所性炎症の進行期における白血球数の減少、犬の若齢期にみられる環境不適應による白血球数の増加などのように白血球の動態は動物種により必ずしも一定ではない¹⁾。このような病例では疾病に対して予想される反応が隠蔽されることになり、病勢の判断を誤る恐れがある。

一方、血漿フィブリノゲン (Pfg) は血漿蛋白の主成分でグロブリンとして分類され、凝血作用に重要な役割を有している。更に、該物質は炎症、外傷及び腫瘍などのみならず潜在的状態のもとでも増加するので、炎症の指標として白血球数よりも鋭敏であると言われている^{5,8-11)}。したがって、Pfg と白血球数及びその百分比との併用は疾病の発見並びに病勢の評価に役立つ¹²⁾。

上述のように Pfg の測定は臨床診断上、有用性が高い。Pfg の測定法は従来から種々報告されているが^{3,4,7)}、いずれも操作が複雑であり、特定の機器を必要とする上、測

定に多くの時間を要することから獣医臨床面への応用には必ずしも適していない。

今回、著者らは Pfg が 56°C で熱変性する性質を利用した簡易測定法の実用性について、ウシ及びイヌの血漿を用いて検討を加えた。

材料及び方法

抗凝血薬として二重シュウ酸塩 (乾燥末 2 mg/血液 1 ml) を用いた。

供試動物はウシ及びイヌを用い、品種、性、年齢並びに健康状態は考慮しなかった。なお、ウシの場合、高濃度の Pfg を得るためにはウシフィブリノゲン (Armour Pharmaceutical Co., U.S.A.) を添加した。

Pfg の簡易測定法としては Millar らの方法 (1971)⁶⁾ 及び Schalm らの方法 (1971)¹¹⁾ を用いた。また、これらの 2 法と塩析比濁法³⁾ 及びチロジン法⁴⁾ とを比較検討した。

Millar らの方法 (M法) は①ミクロヘマトクリット管に抗凝固血を満す。②12,000回転 5 分間遠沈し、56~58°C で 3 分間加温した後、同条件で再度遠沈する。③再遠

* 鳥取大学農学部獣医学科家畜内科研究室

Department of Veterinary Science, Faculty of Agriculture, Tottori University

沈したヘマトクリット管を計測する。④ Fig. 1 に示したフィブリノゲン層の長さ (AB) とフィブリノゲン層に血漿層を加えた長さ (AC) から次式を用いて計算した。AB/AC×100=Pfg (mg/ml)。

Schalm らの方法 (S 法) は① 2 本のヘマトクリット管に抗凝固血を満す。② 双方のヘマトクリット管を 12,000

回転 5 分間遠沈する。③ 1 本のヘマトクリット管の血漿蛋白を屈折計を用いて定量する。④ 他の 1 本は 56~58°C で 3 分間加熱した後、同条件で再度遠沈する。⑤ 再遠沈したヘマトクリット管の血漿蛋白を屈折計で定量する。⑥ Pfg 量は③で定量した血漿の濃度から、⑤で定量した血漿の濃度を差し引きすることにより算出する。

上述の簡易法は、試料としてはいずれも抗凝固血を用いるが、著者らは抗凝固血及び血漿の双方について検討し、また、計測は実体顕微鏡を用いて精確に実施した。

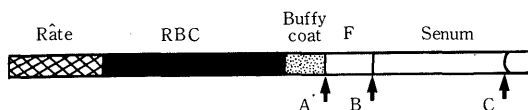


Fig. 1 Diagrammatic representation of the capillary tube contents after the heat precipitation and centrifugation of fibrinogen, showing packed fibrinogen F, buffy coat/fibrinogen interface A, fibrinogen/serum interface band serum meniscus C.

成 績

1 抗凝固血及び血漿における血漿フィブリノゲン値 抗凝固血及び血漿について検討した。ウシの血液を用い、同一サンプルを M 法及び S 法の双方とも 10 回重複測定した。その結果は Table 1 に示した。変動係数 (CV) は M 法及び S 法のいずれも抗凝固血を用いた場合が大きい。

Table 1 Comparison of plasma fibrinogen content between bovine anticoagulated blood and plasma by the Schalm et al. method and Millar et al. method.

Method	Factor	Sample	
		Anticoagulated blood	Plasma
Schalm et al.	Mean ± SD (mg/dl)	5 5 0 ± 3 5 . 4	5 7 0 ± 3 0 . 7
	CV (%)	6 . 4	5 . 9
Millar et al.	Mean ± SD (mg/dl)	6 8 2 ± 2 6 . 0	6 2 3 ± 1 5 . 4
	CV (%)	3 . 8	2 . 5

Sample=10 times quantitative analysis. SD=standard deviation. CV=coefficient of variability.

Table 2 Correlation ratio of plasma fibrinogen content between the simple method and usual method.

Species	Correlation of the method	Regression equation	r	No.
Cattle	S and T	$y = 1.039 X - 18.7$	0.970	19
	S and SN	$y = 0.661 X - 12.8$	0.963	19
	M and T	$y = 0.744 X - 49.6$	0.992	19
	M and SN	$y = 1.154 X - 47.1$	0.985	19
Dog	S and T	$y = 1.268 X - 152.1$	0.913	9
	S and SN	$y = 0.970 X - 164.1$	0.825	9
	M and T	$y = 1.201 X - 87.3$	0.948	9
	M and SN	$y = 1.071 X - 253.4$	0.831	9

S=Schalm et al. method. M=Millar et al. method. T=tyrosine method. SN=method using salting-out and nephelometry. r=coefficient of correlation. No.=number of sample.

Table 3 Comparison of plasma fibrinogen content by the Schalm et al. method, Millar et al. method and tyrosine method.

Species	Factor	Method		
		Schalm et al.	Millar et al.	Tyrosine
Cattle	Mean \pm SD (mg/dl)	4 8 0 \pm 4 4.7	5 3 4 \pm 6.2	570 \pm 19.3
	CV (%)	9.3	2.6	3.4
Dog	Mean \pm SD (mg/dl)	2.2 0 \pm 4 4.7	3 4 3 \pm 8.9 **	340 \pm 11.2**
	CV (%)	2 0.3	3.2	3.3

Sample=5 times quantitative analysis. SD=standard deviation.

CV=coefficient of variability. ** $p < 0.01$, compared with results obtained by Schalm et al. method.

く、また、Pfg はM法が大きい値を示した。

2 簡易測定法と従来の方法との関係

ウシ及びイヌの血漿について、M法及びS法と従来の測定法であるチロジン法及び塩析比濁法によりPfgを測定した。その相関についてTable 2に示した。相関係数(r)はウシで $r > 0.963$ 、イヌで $r > 0.825$ といずれも有意に高い相関が得られた($P < 0.01$)。また、相関係数はウシ及びイヌの双方ともMillarらの方法が高く、塩析比濁法よりチロジン法がいずれの場合にも高い値を示した。

3 再現性について

ウシ及びイヌの血漿を用い、M法、S法及びチロジン法により同一サンプルをそれぞれ5回重複測定を行い再現性を検討した。その成績はTable 3に示した。S法は他の方法に比べてPfg値が低く、また、変動係数は大きい値を示した。一方、M法及びチロジン法はいずれの場合とも類似の値を示した。

考 察

血漿フィブリノゲン簡易測定法のSchalmらの方法及びMillarらの方法では、いずれも抗凝固血が用いられている。抗凝固血を利用することは同一試料で常用検査に共用できる利点がある。しかし、著者らが抗凝固血と血漿について検討したところ、S法、M法ともに血漿の場合が変動係数が小さいことが知られた。抗凝固血を用いる場合における測定値の変動には、M法では分離された各層の境界の明視度、S法では蛋白屈折計の精度が関与しているものと思われる。M法ではbuffy coatが形成されるが、これとフィブリン層の境界の区別は可能であるとされている²⁾。しかし、実際は境界が不明瞭で区別が困難であり、このことが測定値の変動に大きく影響してい

ることが考えられる。したがって、Pfgの測定には分離の時間を多少要するものの、血漿を用いる方がより正確な値を得ることができる。

計測法については、Millarらは顕微鏡ステージ装着の計尺により行っている。また、Blaisdell & Dodds (1977)¹⁾は接眼マイクロメーター装置を用いている。著者らは迅速性と精度を高めるため実体顕微鏡を用いたが、容易にかつ正確に計測することができた。

Pfg測定簡易法のM法については、ヒトではすでに検討され臨床面に応用が可能であることが報告されている^{2,6)}。一方、獣医学界においてはS法をSutton & Hobman (1975)¹²⁾がウシに、Sutton & Johnstone (1977)¹³⁾がイヌに应用した。また、Blaisdell & Doddsはヒト及び各種動物でM法、S法及び標準的測定法とされているRatnoff-Menzie法(1951)⁷⁾とを比較し、M法の再現性はRatnoff-Menzie法に近く、有用な測定法であることを報告している。しかし、わが国では今日までこれらの簡易法についての報告は見当たらない。今回のウシ及びイヌ血漿を用いた従来方法との比較検討結果では、その相関はS法に比べてM法が高く、また、塩析比濁法よりもチロジン法との相関が高いことが示された。チロジン法は血漿に塩化カルシウムを添加し、形成されたフィブリンをフェノール試薬によるチロジンの発色を比較定量する方法で、Ratnoff-Menzie法と同原理を利用したもので、その精度は高いことが知られている。このように他の方法と比較してM法とチロジン法との相関が優れていることはM法の精度が高いことを示すものである。また、再現性についての検討でもS法ではやや劣るものの、M法の変動係数はチロジン法と大差がなく、再現性の高いことが示された。

測定に要する時間についてみると、チロジン法では2

時間、塩析比濁法では45分を要するが³⁾、M法では血漿分離に要する時間を加算しても極端に短く、このことは臨床面への応用に極めて有用性が高い。

要 約

血漿フィブリノゲン簡易測定法である Millar らの方法及び Schalm らの方法を、ウシ及びビヌについて検討した。試料としては抗凝固血よりも血漿が優れており、精度及び再現性では Millar らの方法とチロジン法との間に大差はみられなかった。Millar らの方法は特別な機器を必要とせず、且つ、測定所要時間が短いので獣医臨床面への応用価値が高い。

文 献

- 1) Blaisdell, F. S. and Dodds, W. J. : Evaluation of microhematocrit two methods for quantitating plasma fibrinogen. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **171**, 340-342 (1977)
- 2) Dintenfass, L. and Kammer, S. : Re-evaluation of heat precipitation method for plasma fibrinogen estimation. Effect of abnormal proteins and plasma viscosity. *J. Clin. Pathol.*, **29**, 130-134 (1976)
- 3) 林 隆敏・東条秀徳・山根乙彦：ウシ及びビヌの血漿フィブリノゲン測定法に関する研究。日獣会誌，**31**，145-149 (1978)
- 4) 松岡松三・佐竹清人・深沢 英：Tyrosin 法による血漿フィブリノゲンの定量法。臨床検査，**2**，61-63(1958)
- 5) McSherry, B. J., Horney, F. D., and deGroot, J. J. : Plasma fibrinogen levels in normal and sick cows. *Can. J. Comp. Med. Vet. Sci.*, **34**, 191-197 (1970)
- 6) Millar, H. R., Simpson, J. G., and Stalker, A. L. : An evaluation of the heat precipitation method for plasma fibrinogen estimation. *J. Clin. Pathol.*, **24**, 827-830 (1971)
- 7) Ratnoff, O. D. and Menzie, C. : A new method for the determination of fibrinogen in small samples of plasma. *J. Lab. Clin. Med.*, **37**, 316-320 (1951)
- 8) Schalm, O. W. : Plasma protein : Fibrinogen ratios in dogs, cattle and horses. Part I. Influence of age on normal values and explanation of use in disease. *Calif. Vet.*, **24** (2), 9-11 (1970)
- 9) Schalm, O. W. : Plasma protein : Fibrinogen ratios in disease in the dog and horse. Part II. *Calif. Vet.*, **24** (4), 19-22 (1970)
- 10) Schalm, O. W. : Plasma protein : Fibrinogen ratios in routine clinical material from cats, dogs, horses and cattle. Part III. *Calif. Vet.*, **24** (6), 6-10 (1970)
- 11) Schalm, O. W., Jain, N. C., and Corroll, E. J. : *Veterinary Hematology*. 3rd edn., Lea & Febiger, Philadelphia (1975) pp. 50-138
- 12) Sutton, R. H. and Hobman, B. : The value of plasma fibrinogen estimations in cattle. A comparison with total leucocyte and neutrophil counts. *N. Z. Vet. J.*, **23**, 21-27 (1975)
- 13) Sutton, R. H. and Johnstone, M. : The value of plasma fibrinogen estimations in dogs. A comparison with total leucocyte and neutrophil counts. *J. Small Anim. Pract.*, **18**, 277-281 (1977)