

豚及び鶏における直接蛍光法レチノール測定の実用

紀北家畜保健衛生所

○豊吉久美 石井陽子

松田基宏

【背景及び目的】

血清中ビタミンA濃度については、欠乏症・過剰症をはじめとして血液生化学検査値の中でもその重要性が高いものの一つである。ビタミンA濃度測定を当所では、主に高速液体クロマトグラフィー（以下HPLC）法で血中レチノールをビタミンEとの同時測定法で実施している（図1）。しかし、HPLC法は正確せいは高いが操作が煩雑で、有機溶媒使用が多く危険性を伴う。また、時間と経費がかかるため多検体測定に苦慮しており、ビタミンA欠乏症牛を中心とした測定を行っている。そのため演者らは、平成15年に直接蛍光法による牛血清レチノール簡易測定法について報告し、多検体やビタミンA単独の検査依頼に活用してきた。そこで、この方法を豚及び鶏への応用とその活用法について検討したので報告する。

【方法】（図2）

分析は、蛍光分光高度計FP-750（日本分光社製）を用いた。直接蛍光法は牛血清で行っている方法を用いた。血清150 μ Lを0.1M塩化ナトリウム液3mLで希釈攪拌し、測定用セルに注入、セルホルダーへセットし、泡などの影響を防ぐため5分以上静置した後、励起波長330nm、蛍光波長462nmで測定した。得られた蛍光強度（以下OD値）をHPLC法で測定したレチノール濃度と比較検討した。また、HPLC法レチノール既知血清のOD値を元に検量線を作成した。安定性試験については蛍光光度計へセット後、5分間隔で1時間測定、血清3検体について実施した。同時再現性試験は血清3検体を用い、1検体につき同様の操作で調整した検体を6回測定した。

【検査材料】（表1）

2009年10月から2010年10月に、県内で採材した豚及び鶏の残余血清を用いた。直接蛍光法では、溶血等の色彩サンプル血清での数値が不安定であることがわかっているので省いた。実際のところ、豚については7戸40頭実施予定であったが、省いたサンプルが多く6戸19頭を用いた。鶏は、採卵鶏農家6戸、肉用鶏農家4戸について計48羽を用いた。確認試験には、当所で採血用に飼育している鶏の血清3羽分を用いた。

【結果】

安定性試験では、得られたOD値について、豚血清で変動係数（以下CV値）1.4～3.6%で良好な安定性を示した（表2）。鶏血清についてもCV値0.6～1.3%で良好な結果が得られた（表3）。同時再現性試験では、豚血清3検体でCV値1.0～2.7%となり良好な再現性が認められた（表4）。鶏血清についてもCV値0.8～1.6%で良好な結果が得られた（表5）。OD値とHPLC法でのレチノール濃度の比較では、豚血清の結果についてx-y散布図で正の相

関を認めた ($r=0.9229$) (図3)。鶏血清の結果については、採卵鶏と肉用鶏で違いが認められた。肉用鶏では x y 散布図で正の相関を認めたが ($r=0.8505$) (図4)、採卵鶏では一貫性がなく相関関係は認められなかった (図5)。

【考察1】

試験結果により、直接蛍光法の豚及び肉用鶏への応用は、牛血清と同様の条件下で応用可能と考えられ操作の簡便性、経済性の向上及び時間短縮ができた。しかし、牛血清でレチノール低値(100 IU/dL未満)での直接蛍光法の精度について確定できていない。そのことを踏まえると豚血清はレチノール低値が多く、OD値のバラツキが懸念された。また、本法で検査に不適な溶血等の色彩サンプルが多いこともあり、さらなる検討の余地があると考えられた。鶏血清はレチノール濃度がやや高めなので好条件と考えられた。しかし、採卵鶏の血清は夾雑物が多く本法をそのまま用いることは困難と考えられた。今回の結果において、直接蛍光法現法が、肉用鶏レチノール測定に即応用可能と判断できた。

【肉用鶏への応用】

そこで、検量線作成を行い直接蛍光法による肉用計の血清レチノール測定を行った。(図6)に、農家別の個体プロットをグラフに示した。レチノール濃度は全体的に高いものの、100~400 IU/dL前後と個体差が大きいことがわかった。さらにこの結果を、各農家ごとの平均値±標準偏差のグラフに示した(図7)。M農家、O農家、P農家それぞれの間には有意差($P < 0.005$)を、またMN農家間及びNP農家間で有意差($P < 0.05$)を認めた。

【考察2】

鶏は血液生化学検査値の個体差が大きく、単個体での濃度数値増減を把握することは困難である。今回の肉用鶏レチノール測定結果においても農家間での有意差を認めており、飼育群単位等の多検体の検査が求められるので、本法の応用が期待される。今後、検体数を増やし、飼育群単位や農家ごとのビタミン値の傾向を把握し、データベースとして活用していきたい。