

## ヘモグロビン結合アッセイの改良及び乳牛の分娩後における 牛ハプトグロビン濃度推移

中村正明<sup>1), 2)†</sup> 小山 毅<sup>1)</sup> 松井義貴<sup>1)</sup> 平井綱雄<sup>3)</sup> 南橋 昭<sup>3)</sup>

中田 健<sup>4)</sup> 横田 博<sup>4)</sup> 宮本 亨<sup>5)</sup>

- 1) (地独)北海道立総合研究機構根釧農業試験場 (〒086-1135 標津郡中標津町旭ヶ丘7)
- 2) 新潟県農業共済組合連合会 (〒951-8133 新潟市中央区川岸町3-21-3)
- 3) (地独)北海道立総合研究機構畜産試験場 (〒081-0038 上川郡新得町字新得西5線39-1)
- 4) 酪農学園大学獣医学部 (〒069-8501 江別市文京台緑町582)
- 5) (独)農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所 (〒305-0856 つくば市観音台3-1-5)

(2011年7月25日受付・2012年4月16日受理)

### 要 約

ハプトグロビン (Hp) 測定法の一つであるヘモグロビン結合アッセイ (HBA) を改良し短時間で測定可能なHBAを開発した。本法は一元免疫拡散法と高い相関を示し、再現性も良好であった。健康牛の血中Hp濃度は分娩後3日目で最も高く、以後減少した。分娩後6週から16週における健康牛の血液 (n = 754) の中央値98 µg/ml (平均値110 µg/ml) であり、95パーセンタイル値は170 µg/mlであった。健康な育成牛 (n = 41) では中央値88 µg/ml (平均値91 µg/ml) であった。また分娩直後に発症した急性乳房炎、胎盤停滞牛は健康牛よりもHpが高く、改良HBAによるHp測定は分娩後の乳牛における疾病診断の一助に有用と考えられた。

——キーワード：急性相蛋白，ハプトグロビン，ヘモグロビン結合アッセイ，炎症性疾患，分娩後期間。

----- 日獣会誌 65, 682～688 (2012)

ハプトグロビン (Hp) は急性相蛋白の一つであり、微生物の感染やストレスなどの刺激により、肝臓で産生され、血中に放出される。Hpは炎症により生じた遊離ヘモグロビン (Hb) と結合し、体内からの鉄の損失を防ぐ働きがある [1]。牛では血清Hp濃度が子宮炎 [2]、乳房炎 [3]、蹄病 [4] 及び呼吸器病 [5] などで上昇することが報告されており、炎症性疾患の診断や治療方針の決定などを行う上で有用な指標の一つと考えられている。牛血中Hp濃度の測定法には酵素免疫測定法 (ELISA) 及び一元放射免疫拡散法 (SRID) などがあり、測定キットが市販されている。ELISAは最も高感度な方法だが、高価であり測定に数時間を要する。また、SRIDは操作が簡便であるが、測定に数日間を要する。

ヘモグロビン結合アッセイ (HBA) は、Hpを含む血清にHb試薬を混合し、酸性条件下でHp-Hb複合体の

酵素活性 (ペルオキシダーゼ様活性) を測定し、血清Hp濃度を求める方法である。これはHbが持つペルオキシダーゼ様活性が酸性条件下で失活する一方でHpと複合体を形成した場合に活性が維持されることに基づいている [6]。Makimuraら [6] は、1Mリン酸緩衝液 (pH4.1)、発色剤にオルトジアニジンをを用いたHBAを開発した。この方法は安価であるが、試薬の調製に時間がかかり、反応も試験管内で行う煩雑な方法である。Chanら [7] は酢酸緩衝液 (pH3.6)、発色剤にテトラメチルベンジジン (TMB) をを用い、マイクロプレート上で測定を行えるように簡易化を図った。しかし測定時間はなお1時間を要する。これは未結合のHbが持つ酵素活性を不活化するために必要な時間である。

本研究では遊離Hb活性の不活化に関係する酸性緩衝液の種類とpHについて検討し、さらなる測定時間の短

† 連絡責任者：中村正明 (新潟県農業共済組合連合会事業部家畜課)

〒951-8133 新潟市中央区川岸町3-21-3

☎025-266-4142 FAX 025-266-4169

E-mail : masaaki-nakamura@umin.org

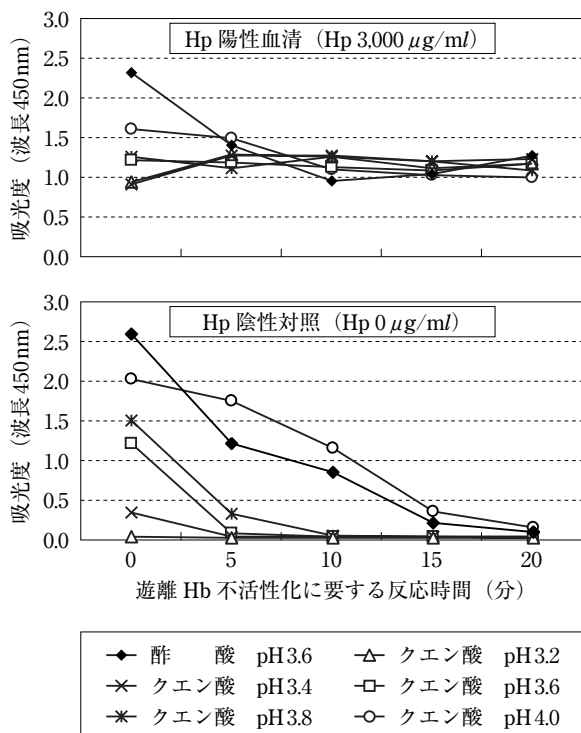


図1 改良HBAにおける酸性緩衝液条件の検討

縮を図り、改良したHBAの測定精度を検討した。また本法により健康な乳牛と育成牛におけるHp基準値や疾病罹患牛（胎盤停滞、乳房炎及び乳熱）の値について検討した。

### 材料及び方法

**供試牛及び血液材料：**根釧農業試験場で飼養されていたホルスタイン乳牛55頭、育成牛41頭及び11の一般農場における乳熱罹患牛11頭を供試した。供試牛は(地独)北海道立総合研究機構動物実験指針に則り可能なかぎり苦痛を取り除かれた状態で飼養された。

根釧農業試験場で飼養されている乳牛については、採食量、疾病罹患歴、乳汁体細胞数・細菌検査成績及び剖蹄履歴を調査し健康牛と疾病罹患牛に分類した。なお、健康牛は農場記録から採血時に臨床的疾患が無いものとした。ただし採血時には臨床的に健康であっても、分娩後に胎盤停滞のあった牛は健康牛に含めなかった。また複数の疾病に同時に罹患したものは除外した。採血は正中尾静脈より行い、血清あるいは血漿は速やかに遠心分離し測定まで-20℃に冷凍保存した。

**改良HBAの測定試薬：**Hb試薬は健康な乳牛の血液から、Makimuraら[6]の方法により調製した。シアンメトヘモグロビン法でメトヘモグロビンの濃度を測定した[8]後、生理食塩水で30mg/mlに調製し、小分けして凍結保存した。冷凍Hb試薬は測定ごとに融解し、生理食塩水で100倍に希釈(0.3mg/ml)して使用した。発色試薬はジメチルスルホキシドに溶解した

22.5mg/mlのTMB溶液110µl及び0.44M過酸化水素水11µlを10,890µlの酸性緩衝液に添加して調製した。発色試薬の調製は発色反応前に行った。標準血清は子宮炎に罹患した乳牛の血清を採取し、SRIDによりHp濃度を決定して用いた。標準血清は小分けして凍結保存し、測定ごとに融解し生理食塩水を用いて希釈して使用した。

**酸性緩衝液の検討：**遊離Hbのペルオキダーゼ活性不活化に関わる酸性緩衝液の条件検討として0.1M酢酸緩衝液(pH3.6)及び0.05Mクエン酸緩衝液(pH3.2-4.0)について検討した。Hp陽性血清(3,000µg/ml)と陰性対照(蒸留水)を用い、次項の手順に準じて測定し、酸性緩衝液添加の経過時間(0, 5, 10, 15及び20分)における吸光度の変化について検討した。

**改良HBA測定手順：**すべての測定は1標本につき同時2ウェルの測定を行った。まず血清及び標準血清をそれぞれ96穴マイクロプレートに5µlずつ添加し、さらに0.3mg/ml Hb溶液20µlを添加して混和した。次に酸性緩衝液100µlを加えて混和後、37℃で静置し、遊離Hbを不活性化した。直前に調製した発色試薬100µlを各ウェルに入れ室温で静置した。5~10分後、1N塩酸50µlを添加して反応停止後、マイクロプレートリーダー(Wallac 1420 ARVOsx, Perkin Elmer, U.S.A.)を用いて450nmの吸光度を測定した。標準血清の吸光度から標準曲線を作製し、検体のHp濃度を算出した。標準血清よりも高い濃度の検体については希釈して再測定した。

**SRID測定：**市販のHp測定キット(ウシ・ハプトグロビン定量用キット「ウシHpプレート-エコシステム」, (株)メタボリックエコシステム研究所, 宮崎)を使用した。

**改良HBAの測定精度検討：**測定精度の検討として以下の試験を行った。SRIDと改良HBAの比較検討：乳牛99頭の血清のHp濃度を改良HBAとSRIDで測定し、両者の測定値の関係を検討した。添加回収試験：Hp濃度の異なる3つの牛血清(66, 302及び1,044µg/ml)10容積に、それぞれ3種類の精製した牛Hp溶液(5,000, 10,000及び20,000µg/ml)1容積を加えてHp濃度を測定し、添加回収量を算出した。精製牛Hpは(株)メタボリックエコシステム研究所から分与されたものを用いた。

**再現性試験：**乳牛4頭の血清を使用し、同時再現性試験ではそれぞれの血清を1枚のマイクロプレートの10の穴に添加してHp濃度を測定した。またプレート間再現性試験では、それぞれの血清を5日間で12枚のマイクロプレートに添加し、Hp濃度を測定した。希釈直線性試験：乳牛2頭の血清(1,000及び2,500µg/ml)を蒸留水で2, 4, 8及び16倍に希釈し、Hp濃度を測定した。

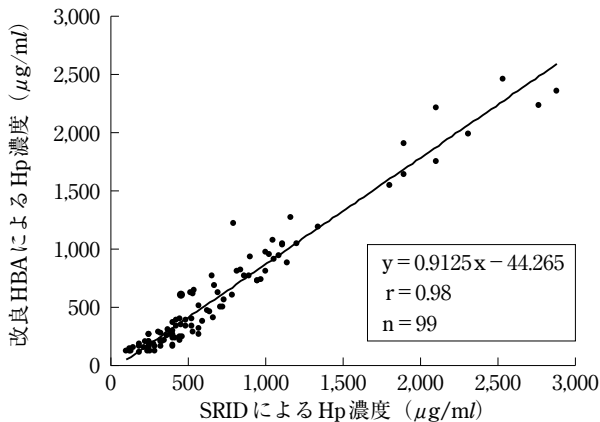


図2 SRID及び改良HBAによるHp濃度の比較

**血液抗凝固剤による影響の検討：**乳牛53頭から血液を採取して4種類の採血管に分注し分離後、それぞれのHpを測定し比較検討した。採血管は市販品を利用した(ベノジェクトII真空採血管, テルモ(株), 東京: 血清分離管(VP-AS109K), ヘパリンNa(VP-H100K), EDTA-2Na(VP-NA052K)及び血糖用採血管[フッ化Na(NaF) + ヘパリンNa + EDTA-2Na](VP-FH072K))。

**健康牛のHp濃度の検討：**健康牛におけるHp濃度の基準値を検討するために、乳牛51頭、育成牛41頭のHp濃度を測定した。乳牛については分娩後1, 3, 7及び10日目, 2週目以降は16週目まで1週に1または2回の採血を行った。育成牛については採血時月齢6から16カ月齢の育成牛を試験に供した。また、分娩後6週から16週の血液 (n = 754) を一つの健康牛の母集団としてHp濃度分布の検討を行った。

**疾病罹患牛のHp濃度の検討：**急性乳房炎罹患牛10頭の診断時(分娩直後~2日目), 胎盤停滞罹患牛7頭の分娩後3日目, 及び乳熱罹患牛11頭の診断時(分娩直後~2日目)に採血し, 血清のHp濃度を改良HBAで測定した。各種乳房炎及び胎盤停滞の診断はそれぞれ成書[9, 10]に基づいて行った。乳熱罹患牛は血清イオン化Ca濃度0.7mmol以下を示し起立不能を呈した牛のうち, 他の臨床的な疾病は認められずCa製剤の輸液で回復した牛とした。

**統計解析：**表計算ソフト(Excel 2003, Microsoft Corp, U.S.A.)及び(エクセル統計2008, (株)社会情報サービス, 東京))を用いた。測定サンプルのHp値の正規性の検定にはKolmogorov-Smirnov検定を用いた。SRIDと改良HBAの測定値の関係の検討にPearsonの積率相関係数及びBlandら[11]の方法に基づいたBland-Altman解析を用いた。Limits of Agreementは平均値±1.96標準偏差(SD)とした。血液抗凝固剤の違いによるHp測定値の比較検討にはFriedman検定を

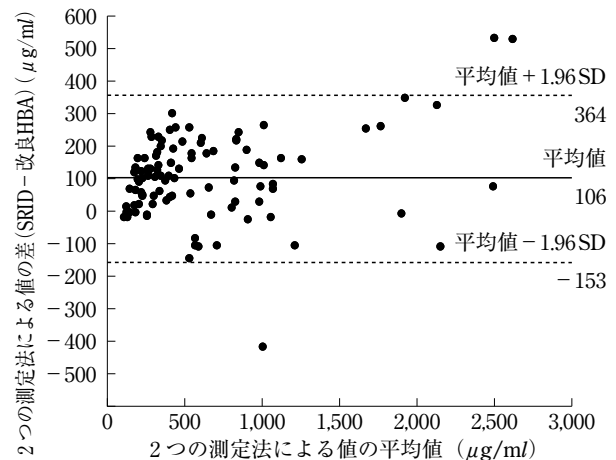


図3 SRIDと改良HBAの測定値によるBland-Altman plot (n = 99)

行い, 次にScheffe法を用いて各群の関係を検討した。健康牛の分娩後1日とそれ以降, 及び育成牛Hp濃度の有意差検定にはSteel検定を用いた。また分娩後における健康牛と疾病罹患牛の比較にはMann-Whitney検定を用いた。

## 成 績

**酸性緩衝液の検討：**図1に0.1M酢酸緩衝液(pH3.6)及び0.05Mクエン酸緩衝液(pH3.2-4.0)におけるHp陽性血清と陰性対照の吸光度の変化を示した。陰性対照では0.05Mクエン酸緩衝液pH3.2-3.6を用いた場合5分以内に吸光度が0付近に安定した。しかし0.05Mクエン酸緩衝液pH3.8-4.0及び0.1M酢酸緩衝液では安定に10分以上を要した。Hp陽性血清では0.05Mクエン酸緩衝液pH3.2-3.8を用いた場合に5分以内で吸光度が安定したが, 0.05Mクエン酸緩衝液pH4.0及び0.1M酢酸緩衝液では安定に10分以上を要した。またpH3.6のクエン酸緩衝液を用いた場合, HpとHbの結合に要した反応時間は0分であった。以上の結果から, 改良HBAでは遊離Hb不活性化にはpH3.6の0.05Mクエン酸緩衝液を使用し, 反応時間を15分とした。またHpとHbの結合のための反応時間を3分とした。測定に要する時間は合計22分程度となった。

**改良HBA法の測定精度の検討：**乳牛99頭の血清を用いたSRIDと改良HBAの比較検討では, 両方法の測定値を比較したところ高い相関関係(R = 0.98)が認められた(図2)。またBland-Altman解析において, 2種類の測定値の差の平均値は106µg/mlであり, データプロットは平均値±1.96SD(-153から364µg/ml)の範囲に97%(96/99)が含まれた(図3)。添加回収試験では, 精製した牛Hpを牛血清に添加した場合のそれぞれの回収率は93~106%と良好であった。再現性試験では同時再現性試験の変動係数は2.2~6.1%, プレ



表1 改良HBA法の再現性試験

	Hp (μg/ml)		変動係数 (%)
	平均値	標準偏差	
同時再現性			
血清 1	75	4.6	6.1
血清 2	152	5.7	3.8
血清 3	565	18.3	3.2
血清 4	1,075	23.3	2.2
プレート間再現性			
血清 1	75	8.1	10.8
血清 2	153	5.2	3.4
血清 3	545	33.0	6.1
血清 4	1,022	36.8	3.6

表2 血液抗凝固剤が改良 HBA の Hp 測定値に及ぼす影響 (n=53)

市販採血管の抗凝固剤	Hp (μg/ml)		有意差*
	平均値	標準偏差	
EDTA-2Na	776	874	a
ヘパリンNa	796	913	a
NaF+ヘパリンNa+EDTA-2Na	365	411	b
凝固剤なし(血清)	791	905	a

\*異文字間に有意差あり (P<0.01)

表3 健康牛のHp濃度の推移

乳牛	分娩後血液採取時期	供試頭数	Hp (μg/ml)						P値*	
			平均値	標準偏差	25パーセントタイル値	中央値	75パーセントタイル値	最小値		最大値
分娩後の成牛	1日	28	197	216	102	133	172	66	1,081	—
	3日	26	376	330	138	269	446	85	1,167	0.05
	7日	28	147	122	95	110	121	60	623	0.91
	10日	18	133	63	103	107	141	82	331	1.00
	2週	24	100	38	78	101	107	42	212	0.06
	3週	51	122	78	90	102	118	38	509	0.15
	4週	49	137	143	87	101	118	26	960	0.16
	5週	38	104	27	89	99	111	55	184	0.04
	6週	51	105	47	85	98	115	24	365	0.02
	7週	36	107	36	88	99	112	65	234	0.06
	8週	48	104	40	86	95	109	60	324	0.01
	9週	41	121	58	94	101	124	57	291	0.31
	10週	42	101	34	86	96	111	64	287	0.01
	11週	34	103	25	91	100	109	69	199	0.03
	12週	44	99	21	90	99	113	53	164	0.02
	13週	34	103	20	91	99	110	69	169	0.07
14週	33	122	87	88	101	120	69	565	0.21	
15週	25	125	101	93	99	112	77	575	0.18	
16週	28	106	34	87	99	114	45	216	0.12	
育成牛(生後6~16カ月)		41	91	24	74	88	103	63	160	<0.01

\*分娩後1日のHpとの有意差検定におけるP値

ート間再現性試験の変動係数は3.4~10.8%と良好であった(表1)。希釈直線性試験では、乳牛2頭のいずれの血清においても2倍から16倍までの希釈で高い直線性が得られた。

**血液抗凝固剤による影響:**血液抗凝固剤がHp測定値へ及ぼす影響についての結果を表2に示した。血清のHp測定値は、EDTA-2Na血漿及びヘパリンNa血漿のHp測定値との間に有意差が認められなかった。しかし血糖用採血管血漿のHp測定値は、血清、ヘパリンNa血漿及びEDTA-2Na血漿のHp測定値との間に有意差が認められた。

**健康牛における血中Hp濃度:**健康な乳牛の乳期の経過におけるHp濃度の推移を表3に示した。Hp濃度の平

均値と中央値は、分娩日(0日)ではそれぞれ199, 133 μg/ml, 分娩3日後にはそれぞれ376, 269 μg/mlと上昇を示したが、分娩7日目以降は低下した。6~22カ月齢の育成牛のHp濃度の平均値と中央値はそれぞれ91及び88 μg/mlであった(表3)。分娩後1日目におけるHpとの有意差検定では、5週, 6週, 8週, 10週, 11週, 12週及び育成牛で有意差が認められた。分娩後6~16週の健康牛サンプル(n=754)におけるHp濃度の平均値と中央値はそれぞれ110及び98 μg/mlであり、95パーセントタイル値は170 μg/mlであった(図4)。

**疾病罹患牛における血中Hp濃度:**急性乳房炎、胎盤停滞、及び乳熱牛のHp濃度を表4に示した。分娩直後~2日に採血した急性乳房炎の血中Hp濃度の平均値は

改良HBAによる分娩後の牛血中ハプトグロビン濃度の測定

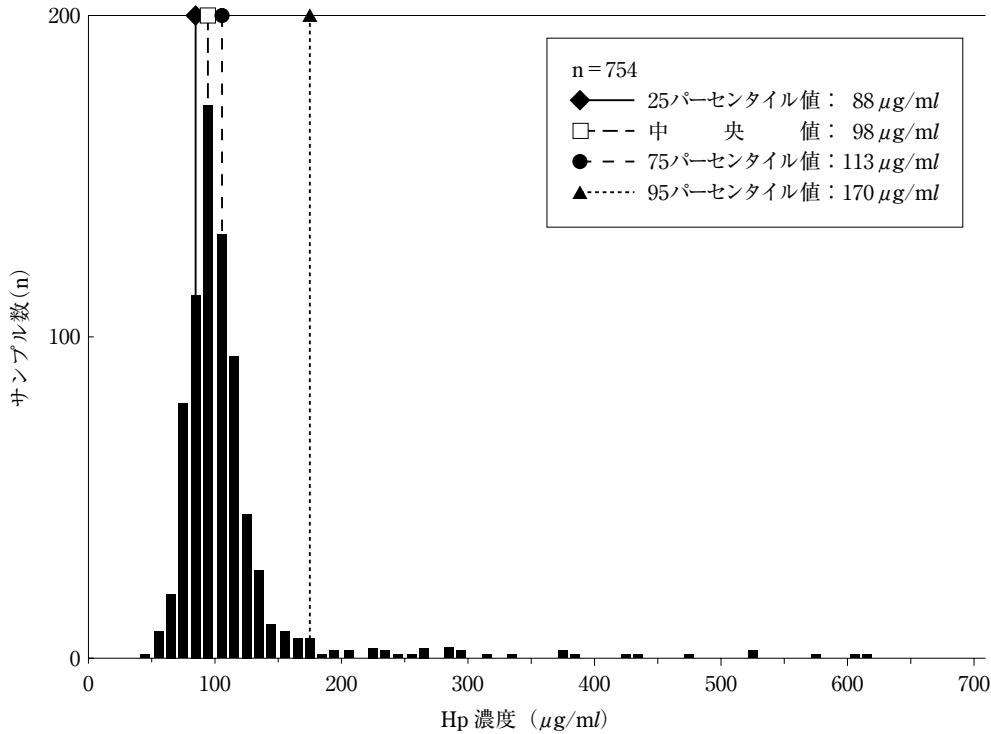


図4 分娩後6～16週における健康牛のHp濃度ヒストグラム

表4 乳牛のHp濃度

乳牛	分娩後血液採取時期	供試頭数	Hp (µg/ml)						P値	
			平均値	標準偏差	25パーセンタイル値	中央値	75パーセンタイル値	最小値		最大値
急性乳房炎	分娩直後～2日	10	1,259	1,114	612	963	1,454	346	4,142	<0.01 <sup>a</sup>
胎盤停滞	3日	7	2,010	736	1,600	2,149	2,475	793	2,980	<0.01 <sup>b</sup>
乳熱	分娩直後～2日	11	301	319	129	147	334	89	1,152	0.19 <sup>a</sup>

a : 分娩後1日目における健康牛のHpとの有意差検定におけるP値

b : 分娩後3日目における健康牛のHpとの有意差検定におけるP値

1,259 µg/mlと高値であり、健康牛の分娩後1日と比較して有意差が認められた。分娩3日後に採血した胎盤停滞牛のHp平均値は2,010 µg/mlであり分娩3日後の健康牛と比較して有意差が認められた。なお胎盤停滞牛は、分娩後5.7 ± 2.0日で発熱や食欲不振などの臨床症状を示し治療を必要とした。乳熱牛のHp平均値は、301 µg/mlであり分娩後1日の健康牛との間に有意差は認められなかった。

考 察

HBAで最も時間を要するのはHpと結合しなかった遊離Hbの酵素活性の不活化であり、この反応に、Makimuraら [6] は1Mリン酸緩衝液 (pH4.1) で約45分、Chanら [7] は0.1M酢酸緩衝液 (pH3.6) で約1時間としている。改良HBAは0.05Mクエン酸緩衝液を用い、pH3.2-3.6を用いると10分以内に不活化することができ、全体の操作時間も、Chanら [7] の75分

に対し、22分程度と大幅に短縮できた。改良HBAとSRIDによるHp濃度の相関係数 (r) は0.98と高く、Bland-Altman解析では平均値 ± 1.96SDの範囲においてデータプロットの97%が含まれ改良HBAはSRIDと同等の測定値が得られた。また再現性、直線性も良好であり、改良HBAは牛血中Hp濃度の測定に十分な精度と再現性を持つと考えられる。

血液抗凝固剤としてヘパリンNaやEDTA-2Naを用いた血漿と血清との測定値の間に差はなく使用上の問題はないと考えられた。しかしNaFを含む血糖用採血管血漿では著しく測定値が低下し改良HBAによるHp濃度測定には不適であった。これはNaFによる酵素活性阻害のためと推測される。

疾病診断の基準となる値を設定するため、健康な搾乳牛の乳期の経過に伴う血中Hp濃度を測定した。本研究では農場の疾病記録から臨床的な疾病のある個体は除外した。潜在的な子宮の炎症による影響などを避け、

Huzzeyら [2] の報告を参考にして、分娩後6週から16週の754標本を一つの健康牛の母集団とした。これら標本の95%タイル値は170 $\mu\text{g/ml}$ であった。また6~16カ月齢の健康な育成牛のHp濃度は、平均値91 $\mu\text{g/ml}$ 、中央値88 $\mu\text{g/ml}$ であり、すべて170 $\mu\text{g/ml}$ 以下であった(表3)。この結果から170 $\mu\text{g/ml}$ を改良HBAの分娩後6週から16週の基準値とした。HBAを用いた場合の正常値については、Chanら [7] は83.6 $\mu\text{g/ml}$ (育成牛)、Eckersall [12] は0~100 $\mu\text{g/ml}$ (育成牛)と報告しており、今回の結果とはほぼ同じであった。分娩後1日目のHpは3日目~4週目のHpと有意差が認められなかったが、Hp濃度の平均値と中央値は分娩後1日目及び3日目に上昇を示した後に、7日目以降には170 $\mu\text{g/ml}$ 以下で推移した。今後、分娩後1日目~5週の基準値については例数を増やすとともに、潜在的な疾病の関連について検討する必要があると考えられた。

乳房炎の診断指標として、乳中Hp濃度はカリフォルニア・マスタイトテストや体細胞数よりも感度が高かったと報告されている [3]。今回分娩直後~2日目に発症した急性乳房炎牛は同時期の健康牛と比較して有意に高かった。したがって、血清Hp測定も乳房炎の診断や経過観察の一助になると考えられる。

胎盤停滞罹患牛のHp濃度は分娩日、分娩3日後の健康牛と比較して有意に高かった。胎盤停滞罹患牛は子宮炎や子宮内膜炎発生の危険性がある [13]。今回用いた胎盤停滞罹患牛でも分娩後5.7 $\pm$ 2.0日で発熱や食欲不振などの臨床症状を示し治療を必要とした。したがって胎盤停滞罹患牛でのHp上昇は、残存胎盤の存在による炎症などに関連し、その診断に有用と考えられる。

乳熱罹患牛のHp濃度は、分娩日、分娩3日後の健康牛との間に有意差はなかった。Skinnerら [14] も乳熱やケトosisなどの代謝性疾患ではHpは上昇しないと報告しており、乳熱がHp濃度の上昇に直接関与している可能性は低いと考えられた。

今回確立した改良HBAは、0.05Mクエン酸緩衝液(pH3.6)を用いることにより約22分と迅速に牛血中Hp濃度を測定することが可能であり、測定法として十分な精度と再現性を有することが示された。また分娩直後のHp濃度については、変動が大きく今後検討する必要があるが、分娩直後に起こる胎盤停滞や急性乳房炎では、同時期の健康牛より有意に高い値を示した。本法によるHp測定は迅速で、マイクロプレートリーダーを用いて測定可能であり、乳牛の分娩後の炎症性疾患の診断の一助として有用と考えられる。

本研究は畜科学技術振興機構平成20年度シーズ発掘試験採択課題「ウシ急性相蛋白の臨床応用の研究」(01-101)

の一部であり研究資金の支援を得た。また材料等の提供や試験遂行には北海道立総合研究機構根釧農業試験場 草刈直仁場長、畜産試験場 伊藤めぐみ研究主任、根釧農業試験場乳牛グループ農場職員諸氏、及び(株)メタボリックエコシステム研究所 鹿野 信氏にご協力いただいた。本稿を終えるにあたり感謝を申し上げる。

## 引用文献

- [1] Murata H, Shimada N, Yoshioka M : Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis : an overview, *Vet J*, 168, 28-40 (2004)
- [2] Huzzey JM, Duffield TF, LeBlanc SJ, Veira DM, Weary DM, von Keyserlingk MA : Haptoglobin as an early indicator of metritis, *J Dairy Sci*, 92, 621-625 (2009)
- [3] Safi S, Khoshvaghti A, Jafarzadeh SR, Bolourchi M, Nowrouzian I : Acute phase proteins in the diagnosis of bovine subclinical mastitis, *Vet Clin Pathol*, 38, 471-476 (2009)
- [4] Smith BI, Kauffold J, Sherman L : Serum haptoglobin concentrations in dairy cattle with lameness due to claw disorders, *Vet J*, 186, 162-165 (2010)
- [5] Angen O, Thomsen J, Larsen LE, Larsen J, Kokotovic B, Heegaard PM, Enemark JM : Respiratory disease in calves : microbiological investigations on trans-tracheally aspirated bronchoalveolar fluid and acute phase protein response, *Vet Microbiol*, 137, 165-171 (2009)
- [6] Makimura S, Suzuki N : Quantitative determination of bovine serum haptoglobin and its elevation in some inflammatory diseases, *Jpn J Vet Sci*, 44, 15-21 (1982)
- [7] Chan JP, Chu CC, Fung HP, Chuang ST, Lin YC, Chu RM, Lee SL : Serum haptoglobin concentration in cattle, *J Vet Med Sci*, 66, 43-46 (2004)
- [8] 竹内 恵 : シアンメトヘモグロビン法, 臨床検査法提要, 金井正光編, 第32版, 273, 金原出版, 東京 (2005)
- [9] 浜名克己 : 乳房炎, 獣医繁殖学, 森 純一編, 第2版, 408-419, 文永堂出版, 東京 (2001)
- [10] 澤向 豊, 中尾敏彦 : 胎盤停滞, 獣医繁殖学, 森 純一編, 第2版, 377-380, 文永堂出版, 東京 (2001)
- [11] Bland JM, Altman DG : Comparing methods of measurement : why plotting difference against standard method is misleading, *Lancet*, 346, 1085-1087 (1995)
- [12] Eckersall PD : Acute phase reactants in diseases of dog and cattle, *Animal clinical biochemistry : the future* Blackmore DJ, et al eds, 225-230, Cambridge University Press, Cambridge (1988)
- [13] LeBlanc SJ : Postpartum uterine disease and dairy herd reproductive performance : a review, *Vet J*, 176, 102-114 (2008)
- [14] Skinner JG, Brown RA, Roberts L : Bovine haptoglobin response in clinically defined field conditions, *Vet Rec*, 128, 147-149 (1991)

Modification of Hemoglobin Binding Assay and Measurement  
of Bovine Haptoglobin in Postpartum Period

Masaaki NAKAMURA\*<sup>†</sup>, Takeshi KOYAMA, Yoshitaka MATSUI, Tsunao HIRAI,  
Akira MINAMIHASHI, Ken NAKADA, Hiroshi YOKOTA  
and Toru MIYAMOTO

\* *Nigata Prefectural Federation of Agricultural Mutual Aid Associations, 3-21-3 Chuoku-Kawagishichou, Nigata, 951-8133, Japan*

SUMMARY

Hemoglobin Binding Assay (HBA), one of the methods of bovine serum haptoglobin (Hp) analysis, was modified to shorten the reaction time. The values of bovine serum Hp determined by modified HBA highly correlated with those determined by single radial immunodiffusion assay, and the assay reproducibility (intra- and inter-assay) was acceptable. In healthy postpartum cows, the concentration of serum Hp was elevated until 3 days after parturition and subsequently decreased. The values of the mean, median, and 95th percentile in healthy cows (6–16 weeks after parturition, n = 754) were 110, 98, and 170  $\mu\text{g/ml}$ , respectively. The median value in healthy heifers (n = 41) was 88  $\mu\text{g/ml}$  (mean 91  $\mu\text{g/ml}$ ). The levels of serum Hp in cows suffering from post parturient mastitis and a retained placenta were significantly higher than those in healthy cows (1 and 3 days after parturition). Serum Hp was significantly high in cows with acute mastitis or clinical mastitis, compared to those in healthy cows. These results suggest that the modified HBA could be a useful method for diagnosis in postpartum cows.

— Key words : acute phase protein, haptoglobin, Hemoglobin Binding Assay, inflammatory disease, postpartum period.

<sup>†</sup> *Correspondence to : Masaaki NAKAMURA (Nigata Prefectural Federation of Agricultural Mutual Aid Associations)*

*3-21-3 Chuoku-Kawagishichou, Nigata, 951-8133, Japan*

*TEL 025-266-4142 FAX 025-266-4169 E-mail : masaaki-nakamura@umin.org*

*J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 65, 682 ~ 688 (2012)*