

# 12 血清銅測定法の検討及び比色定量法による県内黒毛和種子牛・育成牛の血清銅値の調査

中央家畜保健衛生所  
鬼塚 伸幸

家畜の正常な発育及び健康に不可欠である必須微量元素で、各種酵素の成分であり、肝臓で産生されるセルロプラスミンにより運搬・代謝され、ヘモグロビン生成、組織からの鉄の動員、被毛の着色などに関与し、欠乏すると被毛の退色、貧血、下痢、神経障害等を起こす。

銅中毒では、急性で嘔吐、筋麻痺、神経症状、慢性で溶血、黄疸、血色素尿などを起こし、剖検で肝臓黄色化、腎臓黒色化などがみられる。

近年、全国的に飼料添加物や銅含量の高い飼料を給与された子牛や牛用飼料を給与されためん羊などで毎年のように銅中毒の発生がみられている<sup>1, 2, 3, 4, 5, 6</sup>。また、銅欠乏症も散発している<sup>7, 8</sup>。

万が一、銅中毒や、銅欠乏症が発生した場合には、血清や肝臓等の銅の測定が必要となるが、一般的な測定方法である原子吸光分光光度計が当家畜保健衛生所にはないことから、血清銅測定法について、その他の測定方法を検討するとともに、県内の黒毛和種の子牛・育成牛の血清銅値を把握するために調査を実施したので報告する。

## 1 材料と方法

### (1) 血清銅測定法の比較検討

材料として、令和4年度牛アルボウイルス感染症サーベイランス事業（以下、アルボ事業）で採材された51～235日齢の健康な子牛・育成牛の血清69検体（黒毛和種64検体、ホルスタイン種2検体、褐毛和種3検体）を用いた。農研機構動物衛生研究部門ホームページの「家畜における生化学病性鑑定のための臨床生化学的検査マニュアル -1」で示された試験管を用いる比色定量法（以下、比色法）<sup>9</sup>とマイクロブ

レートを用いた簡易比色法（以下、MP法）を用い、測定の手順数、時間及び費用を比較し、両方の相関関係をみた。比色法に必要な試薬は、図-1のとおりでキレート剤として、パソクプロインジスルホン酸二ナトリウム用い、各検査試薬は事前に作製し小瓶にストックしておいた。比色法の手順は図-2に示した。

### (1) 必要試薬

- 銅標準液 (1,000mg/dL)
- 塩酸 (精密分析用)
- トリクロロ酢酸 (特級)
- L(+)-アスコルビン酸
- 酢酸ナトリウム三水合物
- パソクプロインジスルホン酸二ナトリウム



### (2) 検査試薬

- 以下の検査試薬を事前に作製
- 銅測定用標準液 (25, 50, 75, 100, 150, 200µg/dL)
  - 1N塩酸
  - 20%トリクロロ酢酸溶液
  - 0.2%アスコルビン酸溶液
  - 発色液
- パソクプロインジスルホン酸二ナトリウム20mgを2mol酢酸ナトリウム溶液100mLに溶解



図-1 比色法の必要試薬

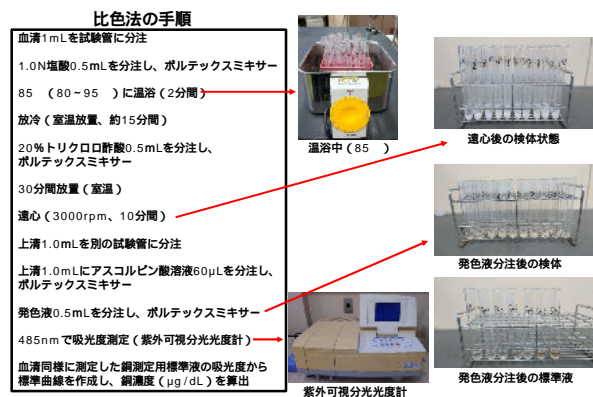


図-2 比色法の手順

MP法は3,5-DiBr-PAESAをキレート剤とした市販の検査キット「メタロアッセイ銅測定LS」(図-3)を用い、その手順は図-4に示した。

(1) 必要検査キット

- メタロアッセイ銅測定LS (メタロジェニクス株式会社製)
- 緩衝液
- キレート試液 (3,5-DiBr-PAESA)
- 銅標準液 (200µg/dL)

有効期限があり、また、開封後は1か月以内の使用が必要



(2) 発色液

以下の発色液を直前に作製

発色液

1検体あたり、キレート試液 (3,5-DiBr-PAESA) 5µLを緩衝液240µLに混合

図 - 3 MP法の必要試薬

比色法 11手順	MP法 5手順
①血清1mLを試験管に分注	①発色液の調製
②1.0N塩酸0.5mLを分注、ボルテックスミキサー	②血清12µLをマイクロプレートのウェルに分注
③80~95℃に温浴 (2分間)	③発色液240µLを分注
④放冷 (室温放置、約15分間)	④10分間反応 (室温)
⑤20%トリクロロ酢酸0.5mLを分注、ボルテックスミキサー	⑤580nmで吸光度測定 (蛍光発光吸光マイクロプレートリーダー)
⑥30分間放置 (室温)	
⑦遠心 (3000rpm、10分間)	
⑧上清1.0mLを別の試験管に分注	
⑨上清1.0mLにアスコルビン酸溶液60µLを分注し、ボルテックスミキサー	
⑩発色液0.5mLを分注し、ボルテックスミキサー	
⑪485nmで吸光度測定 (紫外可視分光光度計)	

図-5 血清銅測定手順の比較



図-4 MP法の手順

比色法の手順と要する時間	1検体当たり時間*	30検体当たり時間
①血清1mLを試験管に分注	0.77分	23.10分
②1.0N塩酸0.5mLを分注、ボルテックスミキサー	0.45分	13.50分
③80~95℃に温浴 (2分間)	2.00分	2.00分
④放冷 (室温放置、約15分間)	15.00分	15.00分
⑤20%トリクロロ酢酸0.5mLを分注、ボルテックスミキサー	0.32分	9.60分
⑥30分間放置 (室温)	30.00分	30.00分
⑦遠心 (3000rpm、10分間)	10.00分	10.00分
⑧上清1.0mLを別の試験管に分注	0.46分	13.80分
⑨上清1.0mLにアスコルビン酸溶液60µLを分注し、ボルテックスミキサー	0.19分	5.70分
⑩発色液0.5mLを分注し、ボルテックスミキサー	0.27分	8.10分
⑪485nmで吸光度測定 (紫外可視分光光度計)	1.68分	50.40分
	計 61.14分	計 181.20分

\*測定を3回実施した平均値

図-6 血清銅測定時間(比色法)

(2) 県内黒毛和種子牛及び育成牛の血清銅値の調査及び正常範囲の検討

令和4年度アルボ事業で採材された51~375日齢の健康な黒毛和種牛の血清、延べ265検体を用いて、血清銅の測定を行った。

測定方法は、1(1)の血清銅測定法の比較検討の結果から比色法を用いた。

得られた結果を基に百分位数を用いる統計手法<sup>10)</sup>により正常範囲を求めた。

2 成績

(1) 血清銅測定法の比較検討

測定手順は、比色法が11手順、MP法が5手順と、MP法の手順が少なかった(図5)。

測定時間は、比色法では1検体当たり平均61.14分となり、30検体実施した場合には181.2分と試算された。MP法では1検体当たり平均13.9分となり、30検体を実施した場合でも20.5分と試算され、比色法の約1/9の時間で測定可能であった(図-6、図-7)。

MP法の手順と要する時間	1検体当たり時間*	30検体当たり時間
①発色液の調製	70秒	70秒
②血清12µLをマイクロプレートのウェルに分注	39秒	416秒
③発色液240µLを分注	6.25秒	25秒
④10分間反応 (室温)	600秒	600秒
⑤580nmで吸光度測定 (蛍光発光吸光マイクロプレートリーダー)	120秒	120秒
	計 835.25秒	計 1,231秒
	計 13.9分	計 20.5分

\*測定を3回実施した平均値

↑ 約1/9 ↑  
比色法 計 181.20分

図-7 血清銅測定時間(MP法)

測定費用は、表-1に示すとおりで、比色法は、使用した6種類の試薬を1検体当たりの金額に換算し、合計した金額は4.38円となった。一方、MP法は、1検体当たりの金額が226.7円となり、比色法の約52倍であった。また、MP法のキットには有効期限があり、さらに、試薬の入ったパウチの開封後は1か月以内の使用が必要であった。

比色法とMP法との間に相関係数0.539

( $p < 0.01$ ) と正の相関がみられたが、MP 法の値が比色法の 2 倍以上の値を示す検体がみられた (図 - 8)。

表一 血清銅測定費用の比較

1 比色法測定に要する費用								
試薬	価格	必要量	金額	検査薬調整全量	検査薬 1mL 当り金額	1 検体当り検査薬使用量	1 検体当り金額	
銅標準液 100mL	¥2,970	1mL	¥29.70	100mL	¥0.297	0.6mL	¥0.18	
塩酸 500mL	¥1,100	8mL	¥17.60	96mL	¥0.183	0.5mL	¥0.09	
トリクロロ酢酸 500g	¥9,250	20g	¥370	100mL	¥3.700	0.5mL	¥1.85	
L(+)-アスコルビン酸 25g	¥1,199	0.2g	¥9.59	100mL	¥0.096	0.06mL	¥0.01	
酢酸ナトリウム 三水和物 500g	¥1,364	27.2g	¥74.20					
パソクプロイン ススルホン酸ナトリウム 1g	¥18,832	0.02g	¥376.64	¥450.84	100mL	¥4.508	0.5mL	¥2.25
							合計	¥4.38
2 MP法測定に要する費用								
試薬	価格	1 検体当り金額						
メタロアッセイ調剤 S 200回	¥45,342	¥226.7	←	約52倍				

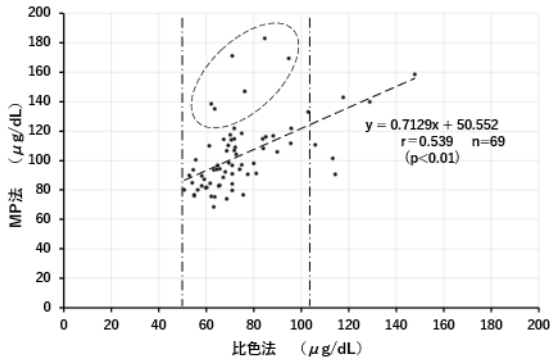


図-8 比色法とMP法の相関

(2) 県内黒毛和種子牛及び育成牛の血清銅値の調査及び正常範囲の検討

比色法を用い、51~375 日齢の健康な黒毛和種子牛の延べ 265 頭の血清銅を測定したところ、平均値(±標準偏差)は  $78.9 \pm 22.5 \mu\text{g/dL}$  となり、日齢にかかわらず、50~100  $\mu\text{g/dL}$  付近に多く分布していた (図 - 9)。

表 - 2 に示すとおり、正常値とされる 70~105  $\mu\text{g/dL}$  の範囲にあったのは 50.2% (133/265 頭) で、この正常範囲を上回ったものは 10.6%、下回ったものは 39.2% と正常値とされる範囲から外れたものが約半数あった。なお、日本飼養標準 肉用牛 2022 年版<sup>11)</sup>で示された欠乏値 (<50  $\mu\text{g/dL}$ ) のものが 2.3%、過剰値 (>150  $\mu\text{g/dL}$ ) のものが 1.5% あった。

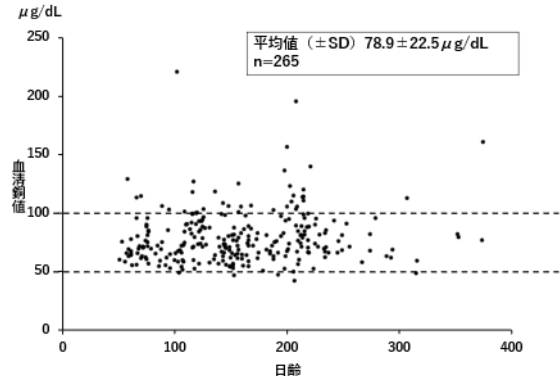


図-9 黒毛和種子牛及び育成牛の血清銅値 (日齢と血清銅値の散布図)

表-2 黒毛和種子牛・育成牛の血清銅値の測定結果 (正常値とされる範囲の割合)

血清銅値 ( $\mu\text{g/dL}$ )	頭数	割合
105<	28	10.6% (28/265頭)
70~105 (正常値とされる範囲*)	133	50.2% (133/265頭)
<70	104	39.2% (104/265頭)
<50 (欠乏値) ※	6	2.3% (6/265頭)
>150 (過剰値) ※	4	1.5% (4/265頭)

\* 農研機構 動物衛生研究部門「家畜における生化学病性鑑定のための臨床生化学検査マニュアル」  
 ※ 日本飼養標準 肉用牛 2022年版 農研機構編 (中央畜産会 2023年)

約半数が、正常値とされる範囲外にあったことから、今回の成績をもとに正常範囲を検討した。正規分布を示さなかったため、百分位数を用いる統計手法で正常範囲を求めたところ、50.4~131.6  $\mu\text{g/dL}$  となった (図 - 10)。

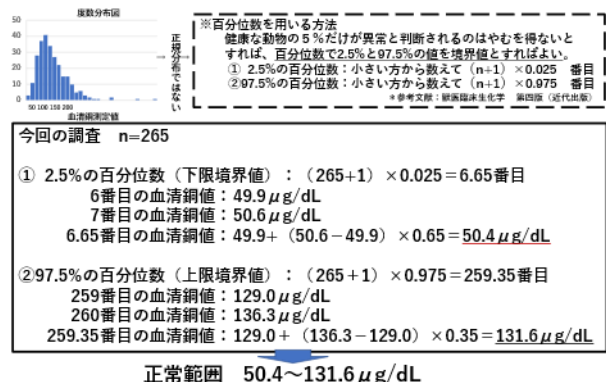


図-10 黒毛和種子牛及び育成牛の血清銅値の正常範囲の検討

### 3 まとめ及び考察

測定法の比較検討では、比色法と MP 法との間に有意な正の相関がみられたが、MP 法の値が比色法の値の 2 倍以上となった検体がみられた。

このことについては、人の領域ではあるが、MP法と同じ3,5-DiBr-PAESAを用いた方法と他法との比較で、3,5-DiBr-PAESA法の値に乖離がみられた検体があり、それらの反応液で白濁もしくは沈殿がみられたとの山田の報告<sup>12)</sup>もあることから、今回も同様の現象があったものと思われ、蛋白の可溶化が十分に行われなかった可能性が考えられた。

MP法は操作が簡単だったが、費用が比色法の約52倍を要し、測定キットの使用期限も限られていた。このことから、日常的に用いる方法としては、比色法が適していると考えられた。

比色法で測定した黒毛和種の子牛、育成牛の血清銅値の平均値は78.9±22.5µg/dLで、今回の調査結果から求めた正常範囲は50.4～131.6µg/dLとなった。

今回の結果を成書や過去の報告<sup>11, 13, 14, 15, 16)</sup>と比較してみたところ、下限値は、50～70µg/dLの報告が多く、また、日本飼養標準肉用牛2022年版に記載されている欠乏値<50µg/dLの境界とほぼ一致した。一方、上限値についての報告は、105～170とやや幅があり、今回の結果は、そのほぼ中間の値となったが、日本飼養標準の過剰値150µg/dLよりは小さい値となった(表-3)。

表-3 牛血清銅の正常範囲等の比較

血清銅 正常範囲 (µg/dL)	参考文献等	畜種
50.4～131.6	今回の結果	黒毛和種子牛・育成牛
70.0～105.0	農研機構 動物衛生研究部門調べ	ホルスタイン種 育成牛
50.0～150.0 (欠乏値 <50)	獣医臨床生化学 第四版 (近代出版 1991年)	動物 (欠乏値は牛,羊)
70.0～170.0 (欠乏値 <50)	主要症状を基礎にした牛の臨床改訂増補 (デーリマン社 557年)	牛
50.0～150.0	新獣医内科学 (文永堂出版 1996年)	牛
62.9～122.4	熊田 日本獣医師会雑誌 50巻 (1997年)	ホルスタイン種 及び黒毛和種
欠乏値 <50 過剰値 >150	日本飼養標準 肉用牛2022年版 農研機構編 (中央畜産会2023年)	牛

これらのことから、銅欠乏症の診断には有効と考えられ、銅中毒の診断にも活用可能と思われた。

今回算出した正常範囲をもとに、発生時の診断に役立てるとともに、今後さらに、データの蓄積を行ってきたい。

#### 4 参考文献

- 1) 松本裕一ほか：周産期に多発したサフォーク種繁殖羊の慢性銅中毒, 日獣会誌, 67, 587-592 (2014)
- 2) 松尾加代子ほか：離乳期に散発した黒毛和種子牛の銅中毒, 日獣会誌, 73, 305-309 (2020)
- 3) 寺本直輝：黒毛和種の銅中毒事例及び血清銅濃度調査, 第60回福島県家畜保健衛生業績発表会集録, 45-47
- 4) 波津久香織ほか：黒毛和種子牛で発生した銅中毒の再発防止対策, 令和3年度大分県家畜保健衛生業績発表会集録, 演題番号5
- 5) 小山祐介：添加飼料が原因となった黒毛和種子牛の銅中毒, 令和3年度千葉県家畜保健衛生業績発表会集録, 63-65
- 6) 岡部知恵ほか：黒毛和種子牛に発生した銅中毒, 令和4年度富山県畜産関係業績発表会集録, 26-30
- 7) 仲宗根一哉ほか：沖縄県で発生した牛の銅欠乏症, 日草九支報, 21, 23-28 (1991)
- 8) 松本裕一ほか：山羊に発生した続発性銅欠乏症, 日獣会誌, 61, 853-857 (2008)
- 9) 山村雄一監修医化学実験法講座：馬場茂明, 奥田清編集, 臨床化学, 389-392, 中山書店, 東京 (1973)
- 10) 獣医臨床生化学 第四版:JIRO.J.KANEKO 編, 4-6, 近代出版, 東京 (1991)
- 11) 日本飼養標準 肉用牛 2022年版：農研機構編, 中央畜産会 (2023)
- 12) 山田満廣：DiBr-PAESAを用いた血清銅測定法の問題点, 臨床検査, 42, 490-491 (1998)
- 13) 獣医臨床生化学 第四版:JIRO.J.KANEKO 編, 759-767, 近代出版, 東京 (1991)
- 14) 主要症状を基礎にした牛の臨床 改訂増補：其田三夫監修, 534-536, デーリマン社, 札幌 (1982)
- 15) 新獣医内科学：村上太蔵ほか編, 546-548, 文英堂出版, 東京 (1996)
- 16) 熊田昇二：牛血清中銅および亜鉛の高速液体クロマトマトグラフィーによる同時定量, 日獣会誌, 50, 262-267 (1997)