牛血中、乳汁中 Progesterone の Enzyme Immunoassay と 早 期 妊 娠 診 断 へ の 応 用

岸本裕治*¹⁾ 加藤 寛*²⁾ 三谷通博*¹⁾

(昭和 61 年 12 月 19 日受理)

Enzyme Immunoassays of Progesterone in Bovine Plasma and Skim Milk and Its
Application to Early Pregnancy Diagnosis
YUJI KISHIMOTO (Kamajima Livestock Hygiene Service Center, Prefecture of Tokushima,
Kamajima, Tokushima 776), HIROSHI KATO, MICHIO MITANI.

SUMMARY

Progesterone concentrations (PC's) in blood plasma and skim milk were estimated by enzyme immunoassay (EIA) in dairy cows in the estrous period and in pregnant cows. Samples were collected nine times at 3 days' intervals after estrus or insemination and examined by an EIA kit produced in West Germany. Pregnancy was diagnosed by the non-return method and rectal examination.

When examined 22 days of the expectant day of next estrus, both plasma and milk PC's were significantly higher ($P < 0.01$) in the pregnant cows than in the other cows. When 88 dairy cows were examined 21 ~ 23 days after insemination, there was a significant correlation ($P < 0.01$) between plasma and milk PC's in them.

The hitting rate of pregnancy and that of sterility were calculated on the condition that pregnancy was positive when PC was 1 ng/ml or more. They were 81.6% (40/49) and 97.4% (38/39), respectively, as calculated from plasma PC, and 76.9% (30/39) and 88.4% (38/43), respectively, as calculated from milk PC. PC's were indicated to be of practical value for diagnosis of early pregnancy in cows.

要 約

乳牛の性周期牛, 妊娠牛について, 発情および授精から 3 日ごとに計 9 回採血・採乳し, 血漿中ならびに脱脂乳中 Progesterone (P) 濃度の変動を酵素免疫測定法によって調べ, さらに早期妊娠診断への応用を試みた。

測定には, 操作が簡便な西ドイツ製の Enzyme Immunoassay Kit を用い, 妊娠の確認は 60 日 Non-return (NR) 法および直腸検査法で行った。次回発情予定日の 22 日目において, 妊娠牛の P 濃度は性周期牛に比べ, 血漿中, 脱脂乳中とも有意に高かった ($P < 0.01$)。そこで, 乳牛 88 頭について授精後 21~23 日の血漿 P 濃度ならびに脱脂乳 P 濃度を測定した結果, それらの間には有意な相関があった ($P < 0.01$)。また, この時の P 濃度で 1 ng/ml 以上のものを妊娠と判定し妊娠診断した結果, 妊娠の中率, 不妊の中率は, 血漿 P 濃度でそれぞれ 81.6% (40/49 頭) と 97.4% (38/39 頭), 脱脂乳 P 濃度で 76.9% (30/39 頭) と 88.4% (38/43 頭) であった。このことから, 本法による早期妊娠診断の実用的価値が示唆された。

家畜繁殖領域において, 牛の体液中の P 濃度を測定することは, 黄体機能を推測するうえで最も有力な手段の 1 つである。しかし, 牛の血中および乳汁中 P 濃度は一般に低値であるために, その測定はなかなか困難で, 従来

試みられてきた生物学的方法や化学的方法では感度も低く非能率的で, 広く用いられるにはいたっていない。

近年, ラジオアイソトープを用い, 抗原抗体反応の原理で開発されたラジオイムノアッセイ法は, 繁殖分野におけるホルモン測定に画期的な進歩をもたらし, 牛の早期妊娠診断への応用も多数報告されている^{5,6,17)}。しかし, この測定法も放射性物質を用いることから特定の施

*¹⁾ 徳島県鴨島家畜保健衛生所 (麻植郡鴨島町麻植塚向麻山北 131-3)

*²⁾ 徳島県 開業 (名西郡石井町藍畑字高畑385-1)

設を必要とし、さらに測定後の廃棄物の処理も深刻な問題となっている。このような背景から、ラジオイムノアッセイの原理はそのまま使い、放射性物質の代わりに酵素を使って測定するエンザイムイムノアッセイ法が開発され、同法によってPの測定が可能であることが報告され注目されている^{1,9,10)}。

今回、著者らは西ドイツで市販されているエンザイムイムノアッセイキットを用い、妊娠牛、性周期牛の血中ならびに乳汁中のP濃度を調べ、さらに早期妊娠診断への野外応用を試みたので、その概要を報告する。

1. 材料および方法

試験実施期間は、昭和60年8月から11月までの間とし、徳島県畜産試験場ならびに徳島県石井町内10戸の農家で飼養されているホルスタイン種乳用牛計100頭を用いて行った。サンプルは、頸静脈血と同時に乳汁を採取し、ただちに血漿と脱脂乳に分離し、測定の日まで-20℃で凍結保存した。測定は、Progesterone Enzyme Immunoassay Kit (Biolab 社、西ドイツ)を用い、吸光度測定には分光光度計(日立、Model 100-10)を用いた。

酵素免疫測定は、血漿は石油エーテルで抽出した後、また脱脂乳については直接法で ARNSTADT ら¹⁾の方法に準じて行った。

試験方法は、まず性周期牛ならびに妊娠牛のP濃度の動態を調べるために、性周期牛および授精後妊娠の確認できた牛(事後判定)から採取した血漿および乳汁中のP濃度の測定を行った。材料牛は各群6頭とし、採血・採乳は発情後または授精後より3日ごとに計9回行った。いっぽう、早期妊娠診断への応用を試みるためには、人工授精を行った88頭について、授精後21~23日の間に1回、採血・採乳を実施した。なお、受胎の確認は交配後60日とし、NR法および直腸検査法の併用にて行った。以後、人工授精の日を妊娠の第1日とした。材料および方法の概略は表1に示した。

表1 材料および方法

供試牛は、乳用牛(畜産試験場ならびに石井町内飼養)100頭

頸静脈血 → 遠心分離 → 血漿
乳 汁 → 遠心分離 → 脱脂乳 → 凍結保存 → 測定

測定は、Progesterone Enzyme Immunoassay Kit (西ドイツ製)で行った。

1. プロゲステロンの動態

性周期牛(6頭): 発情後3日毎、計9回採血採乳
妊娠牛*(6頭): 同上

2. 早期妊娠診断

人工授精後21~23日の間に1回、88頭を採血採乳
プロゲステロン測定

60日NR法および直腸検査法の併用にて妊娠診断

* 発情後授精したもので、妊娠は事後確認

図1 EIAによるプロゲステロンの標準曲線

図2 牛血漿中プロゲステロン濃度の動態

2. 成績

1) Progesterone Enzyme Immunoassay Kit による測定

図1に既知量のPを測定した標準曲線を示した。測定可能な範囲は10~1,000 pg/tubeであった。また、同一試料の反復測定による変動係数は、測定内変動係数5%前後、測定間変動係数10%前後であった。なお、本測定キットは、固相法を用いているため操作が簡便で精度も高く、測定時間は100検体で約6時間であった。

2) 性周期牛、妊娠牛P濃度の動態

性周期牛群、妊娠牛群の血漿中ならびに脱脂乳中P濃

図3 牛脱脂乳中プロゲステロン濃度の動態

度の動態をそれぞれ図2と図3に示した。

牛血漿中P濃度は、発情終了後数日間性周期牛群ならびに妊娠牛群とも0.3 ng/mlと非常に低値であったが、その後徐々に増加し、性周期牛群においては13日目で5.3 ng/mlとピークをむかえた。以後、妊娠牛群では黄体は退化せず4 ng/ml前後の高い値を維持したが、性周期牛群では22日で0.4 ng/mlと急激に減少し、妊娠牛群に比べ有意に低くなり ($P < 0.01$)、一峰性のパターンを示した後、次回発情をむかえた。

いっぽう、脱脂乳中P濃度においても同様に、性周期牛群においては一峰性のパターンを示した後、発情が回帰されたが、妊娠牛群においては次回発情予定日になっても黄体期の濃度を維持し、22日において両群の間に有意差が認められた ($P < 0.01$)。また、19日、22日、25日で有意差が認められたが、その差は22日が最も顕著であった。これらのことから、次回発情予定日にあたる22日前後に血中ならびに乳汁中のP濃度を測定し、早期妊娠診断を試みた。

3) P濃度測定による早期妊娠診断

前回授精時から数えて21日から23日の間にP濃度を測定した88頭中、経産牛82頭の血中ならびに乳汁中P濃度の相関、およびその後60日で直腸検査法にて受胎の確認を行った結果を図4に示した。この図より、血漿P濃度と脱脂乳P濃度の間には、相関係数0.826と有意な相関があった ($P < 0.01$)。また、黄体期における血漿、脱脂乳P濃度はともに1.0 ng/ml以上とされている^{13,14)}が、前述の性周期、妊娠牛のP濃度の動態(図2, 図3)で、22日において妊娠牛群の95%信頼限界の下限值、性周期牛群の上限値などから考え合わせて、今回も1.0 ng/ml以上のものを妊娠、1.0 ng/ml未満のものを不妊と判定し早期妊娠診断を行った。

図5に、P濃度から早期妊娠診断した頭数と、約60日後のNR法および直腸検査法により妊娠診断した頭数

図4 血中、乳汁中プロゲステロン濃度の相関と妊否

妊娠的中率: 81.6%

不妊的中率: 97.4%

妊娠的中率: 76.9%

不妊的中率: 88.4%

図5 プロゲステロン濃度による早期妊娠診断の中率

を比較し、その的中率を示した。血漿P濃度で妊娠と判定したもの49頭中40頭が妊娠、また不妊と判定したものの39頭中38頭が不妊であった。このことより、妊娠的中率81.6%、不妊的中率97.4%であった。同様に脱脂乳P濃度で妊娠と判定したもの39頭中30頭が妊娠、不妊と判定したものの43頭中38頭が不妊で、妊娠的中率76.9%、不妊的中率88.4%であった。

3. 考 察

酵素免疫測定法により、牛血中ならびに乳汁中P濃度の動態を性周期牛、妊娠牛について調べ、早期妊娠診断への応用を試みた。今回供試した88頭での早期妊娠診断的中率は、血漿P濃度による判定(妊娠的中率81.6%、不妊的中率97.4%)、脱脂乳P濃度による判定(妊娠的中率76.9%、不妊的中率88.4%)であり、いずれもかなり高い中率であると考えられた。

HEAP ら⁴⁾ は、血中のPは拡散により乳汁中に移行すると報告している。今回も血中ならびに乳汁中Pの間に有意な相関が認められ、また性周期、妊娠牛のP濃度の動態において黄体からのP分泌状況が、血中ならびに乳汁中に同じように反映されていた。このことは本法を普及する場合において、容易に採取できる乳汁をP測定材料として用いればよいことを示唆している。しかし、乳汁中のPはその多くが乳脂中に含まれているため⁴⁾、測定は乳脂率による影響を受けやすくなる²⁾。そこで、検体となる乳汁の採取法によって、測定値が極端に変化する¹⁵⁾ため誤診を招くおそれがある。したがって、乳汁は常に一定条件のものを用いることが必要である。乳脂率による影響を少しでも除去するため、乳汁中P測定にはよく脱脂乳が用いられている^{8, 12, 14)}。これらの報告によれば、脱脂乳中Pには、搾乳の前後や分房別の差によるP濃度の差がほとんどなく、脱脂乳中と血漿中のP濃度はほぼ同じ値を示すとされている。今回も脱脂乳を用いて良好な成績が得られたが、血漿に比べ多少診断精度が悪かったのが今後の課題と考えられた。

つぎに、妊娠と判定されて不妊であった例のほとんどが、次回発情予定日に明らかな発情の回帰が認められず、授精後 30 日以降に発情の回帰が認められた。このような場合の誤診の原因には、① 授精後の性周期が極端に長い、あるいは短かい場合、② 受精は起こり、黄体は形成されるが、判定後胚死亡や流産が起こる場合、③ 黄体遺残の発症の場合、などが含まれることが考えられ、妊娠の中率は単に測定上の原因によると考えられる不妊の場合の的中率に比べて低いことが予想される。本試験の結果も同様の傾向を示し、これらの事実を反映したものと考えられた。

野外で広く実用的に用いられ、本法と同様の次回発情予定日前後の妊娠診断法として、同時期の発情徴候の発現を規準とするNR法がある。診断の時期は同様であるが、本法の場合にはP濃度測定によって機能的な黄体の存在を確認して判定を行うので、NR法の場合に起こりがちな発情微弱や、発情の見逃しによる誤診に対しても診断を誤ることがなく、信頼性は高いといえる。

以上、今回の結果から、フィールドにおいて次回発情予定日の22日前後に、容易に採材できる乳汁を採取し、乳汁中のP濃度を測定することにより早期妊娠診断が可能となり、本法による実用的価値が示唆され、広く普及

しうるものと考えられた。また、今回主として性周期の確認と早期妊娠診断に用いたエンザイムイムノアッセイ法によるPの測定は、今後、繁殖障害の判定^{6, 7)}、繁殖障害に対するホルモン治療の効果判定^{8, 11, 12)}、受精卵移植牛の選択¹⁰⁾ならびに妊娠診断などにも応用が可能であると考えられるので、今後はこれらの点についての検討も行い、繁殖雌牛の空胎防除をつうじて受胎率の向上をはかってゆきたいと考えている。

最後に終始ご指導をたまわりました大阪府立大学農学部家畜臨床繁殖学教室の森 純一教授に深甚なる感謝の意を表します。

引用文献

- 1) ARNSTADT, K. I. and ADAMPOULOU, B.S.: *Br. Vet. J.*, 138, 436~438 (1982).
- 2) DARLING, J. A. B., KELLY, R. W., LAING, A. H., et al.: *J. Endocr.*, 54, 347~354 (1974).
- 3) DOBSON, H., RANKIN, J. E. F. and WARD, W. R.: *Vet. Rec.*, 101, 459~461 (1977).
- 4) HEAP, R. B., HENVILLE, A. and LINZELL, J. L.: *J. Endocr.*, 66, 239~246 (1975).
- 5) HEAP, R. B., HOLDSWORTH, R. J., GADSBY, J. E., et al.: *Br. Vet. J.*, 132, 445~464 (1976).
- 6) HOFFMAN, B., GUNZIER, O., HAMBURGER, R., et al.: *Br. Vet. J.*, 132, 469~476 (1976).
- 7) LAMMING, G. E. and BULMAN, D. C.: *Br. Vet. J.*, 132, 507~517 (1976).
- 8) McCAUGHEY, W. J. and GORDON, F. J.: *Br. Vet. J.*, 135, 512~519 (1979).
- 9) 守野 繁, 中尾敏彦, 角田修男, ほか: 家畜繁殖誌, 30, 1~8 (1984).
- 10) NAKAO, T.: *Acta Endocr.*, 93, 223~227 (1980).
- 11) 中尾敏彦: 家畜繁殖誌, 27, 126~129 (1981).
- 12) NAKAO, T. and KAWATA, K.: *Proc. 11th Int. Congr. Disease of Cattle, Tel-Aviv*, 2, 916~933 (1980).
- 13) NAKAO, T., SUGIHASHI, A., ISHIBASHI, Y., et al.: *Theriogenology*, 18, 297~274 (1982).
- 14) NAKAO, T., SUGIHASHI, A., SAGA, N., et al.: *Br. Vet. J.*, 139, 109~118 (1983).
- 15) PENNINGTON, J. A., SPAHR, S. L. and LODGE, J. R.: *J. Dairy Sci.*, 64, 259~266 (1981).
- 16) REMSEN, L. G. and ROUSSEL, J. D.: *Theriogenology*, 18, 365~372 (1982).
- 17) SHEMESH, M., AYALON, N. and SHALEVET, E.: *Theriogenology*, 9, 343~352 (1978).