

牛乳中黄体ホルモン測定による乳牛の早期妊娠診断法について

後藤和文・柳田宏一*・紙屋 茂*・花田博之*

江副幹太・中西喜彦・小川清彦

(家畜繁殖学研究室, *入来牧場)

昭和62年8月6日 受理

Application of Enzyme Immunoassay for Milk Progesterone to Early Pregnancy Diagnosis of Holstein Cows

Kazufumi GOTO, Kōichi YANAGITA*, Shigeru KAMIYA*,

Hiroyuki HANADA*, Kanta EZOE, Yoshihiko NAKANISHI,

and Kiyohiko OGAWA

(Laboratory of Animal Reproduction, *Iriki Livestock Farm)

緒 言

乳牛において、その経済性を考えるならば年一産が望ましい。そのためには早期妊娠診断が必要となる。現在、妊娠診断は妊娠40日頃から可能となる胎膜触診法が主流であるが、胎子への影響や技術の習得に問題がある。

近年、Heapら^{2,3)}によって乳中の黄体ホルモン (Progesterone, 以下 P_4 と省略) 濃度が血液中と同様な変動を示すことが明らかにされてきている^{1,4,5)}。しかし、これまでの測定法は、主にアイソトープを標識物質として用いた放射免疫測定法 (RIA 法) であった。このため測定には特別な施設が必要であり、現場での測定が困難であった。ところが近年、RIA 法に比べて簡易に乳中の P_4 濃度を測定できる酵素免疫定量法 (EIA 法) の開発が進み、現場での測定が可能となりつつある。

そこで本研究では、デンカ製薬より入手した英国製 P_4 -EIA キットを用いて乳中の P_4 濃度を測定し、早期妊娠診断 (人工授精後21~24日目) を行った。そして、その後の直腸検査 (人工授精後70日前後) による妊娠診断との一致性およびその実用性について検討した。

材料および方法

測定に供した牛乳は、鹿児島大学農学部附属農場入来牧場に撃養されているホルスタイン種経産牛13頭から採取した。牛乳は、人工授精日と人工授精日より21~24日目のバケットミルク内の混合乳を用いた。サンプル約10mlを15mgの重クロム酸カリウム (防腐

剤)を入れたガラス製小試験管に採取し、測定日まで4°Cで保存した。なお、混合乳をサンプルとして採取したのは、 P_4 が乳脂中に大部分含有され、採取条件の違いによる乳脂率の変動が P_4 濃度に影響を与えることが知られているためである^{3,5)}。

牛乳中の P_4 濃度の測定は、Cambridge Life Sciences社製のOvucheck, Milk Progesterone EIAキットを用いた。

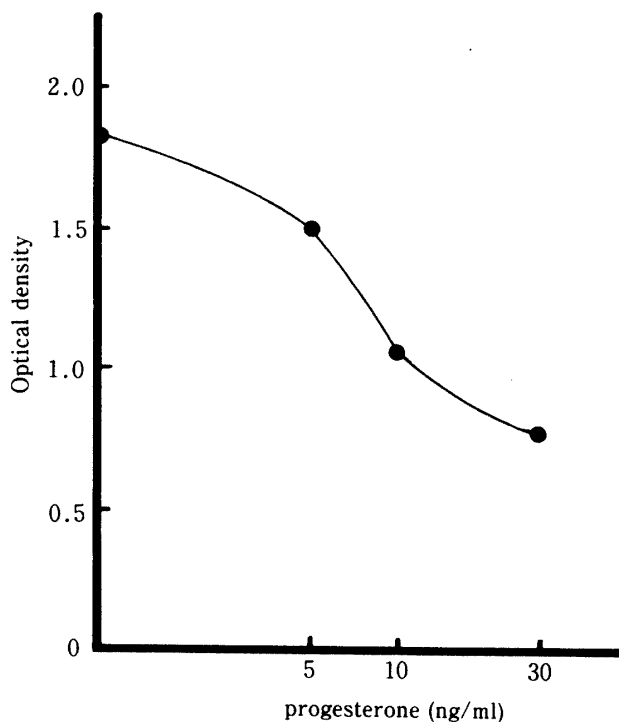


Fig. 1. Standard curve for progesterone determination by enzyme immunoassay.

1. 測定原理

マイクロタイタープレートのウェル(固相)に固着された P₄ 抗体に対して、牛乳中または標準液中の P₄ と酵素で標識された P₄ とが、競合結合することを利用した第一抗体固相法による EIA である。

すなわちウェルには一定量の P₄ 抗体が固着しており、牛乳サンプルを加えると存在する P₄ が抗体と結合する。そして、アルカリ性ホスファターゼ (ALP) 酵素でラベルした酵素標識 P₄ を加えると、先に加えた牛乳サンプル中の P₄ の量に逆比例して、酵素標識 P₄ がウェル内の抗体と結合する。その後ウェル内の未結合の酵素標識 P₄ を除去し、基質溶液を加えると、抗体と結合している酵素標識 P₄ の酵素が反応して基質が黄色に発色する。これを比色測定して、標準曲線 (Fig. 1) から牛乳中の P₄ 濃度を求めるものである。

2. 測定操作

測定操作の概要は Fig. 2 に示した。

標準液およびサンプル数に見合った数のウェルのラベルをはぎ、ウェル内の安定液を捨てる。次に各標準液 10 μ l, サンプル 10 μ l をそれぞれのウェル内に分注し、同時に ALP 酵素でラベルした酵素標識 P₄ を 200 μ l 各ウェルに分注する。この状態で30分間室温に放置し、この間に基質溶液の調製を行う。放置後、各ウェル内の内溶液を捨て、水洗を3回いよく水をきった後、基質溶液 200 μ l を各ウェル内に分注し再び30分間室温に放置する。放置後反応停止液 100 μ l を各ウェルに分注し、波長 405nm で吸光度測定を行っ

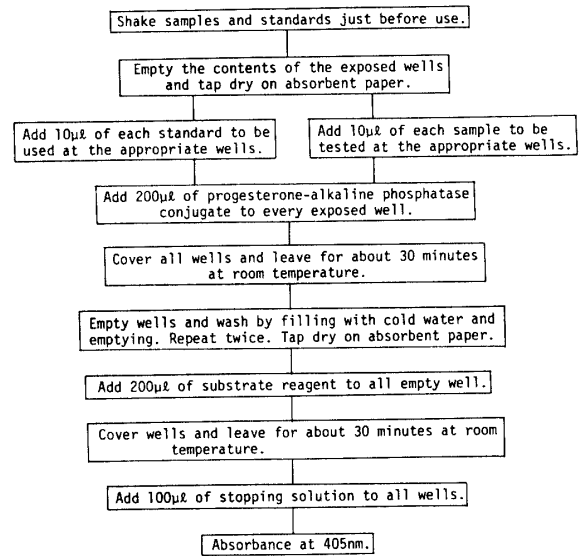


Fig. 2. Procedure for determination of progesterone level in milk by EIA kit.

た。同一測定内、測定間内の変動係数は、各々 6.9% (N=5), また 7.1% (N=5) であった。

3. 妊娠の判定

人工授精より 21~24 日目のサンプルを用い P₄ 濃度が 10ng/ml 以上では妊娠とし、5ng/ml 以下では非妊娠、5~10ng/ml では妊娠不明で再検査の必要性ありとした。また、人工授精より 70 日前後に直腸検査によって、妊娠の確認を行い、EIA 法で判定した妊娠の適中率を求めた。

Table 1. Early pregnancy diagnosis by enzyme immunoassay of milk progesterone in cow.

Cow No.	Progesterone (ng / ml)		Diagnosis	
	Day of insemination	21 to 24 days after insemination	Milk progesterone assay	Rectal palpation
1	≤ 1	17.0	P	P
2	≤ 1			
3	≤ 1	14.0	P	P
4	≤ 1	15.0	P	P
5		21.8	P	P
6		29.3	P	P
7		16.7	P	P
8		19.7	P	P
9	≤ 1	7.5		P
10	≤ 1	9.0		NP
11		8.0		P
12		8.8		NP
13		4.0	NP	NP

P; Pregnancy, NP; Non Pregnancy

結果および考察

測定値および妊娠診断の結果は Table 1. に示した。人工授精日、つまり発情時では測定した6頭全てが1ng/ml以下の低値を示した。授精後21~24日目の値が5ng/ml以下であった個体は非妊娠であった。Coxら¹⁾の報告においても同様に非妊娠牛では5ng/ml以下の値を得ている。これらのことより、発情予定日に5ng/ml以下であれば発情牛であり、授精後21~24日目5ng/ml以下であれば非妊娠であると判断してもよいものと考えられる。

つぎに授精後21~24日目のP₄濃度が5~10ng/mlであった4頭については、この時点では妊娠診断はできなかった。その後の直腸検査の結果では、2頭が妊娠、2頭が非妊娠であり50%の妊娠率であった。谷中ら⁶⁾の報告においても同様に50%の妊娠率であり、Penningtonら⁴⁾が行った8~11ng/mlでの妊娠率も57%と低いものであった。よって5~10ng/mlの個体は数日後に再検査を行う必要があると思われる。

授精後21~24日目のP₄濃度が10ng/ml以上であった7頭については、この時点で妊娠と診断され、その後の直腸検査の結果でも全頭妊娠であることが確認された。同様に谷中ら⁶⁾の報告では、83.7%の妊娠率を得ていることから、10ng/ml以上の場合はまず妊娠していると判断してよいものと思われる。

分娩後の発情を確実にとらえ妊娠させるためには、standing estrusを確認して人工授精を行うとよい。そして人工授精後19日前後にP₄濃度を測定し、5ng/ml以下であれば非妊娠と判断して、数日後の発情日に再び人工授精を行う。もし授精後19日前後にP₄濃度が5~10ng/mlであれば翌日あるいは翌々日に再検査を行い、P₄濃度が10ng/ml以上であれば妊娠と判断してよい。また、standing estrusを示さない場合は、数日おきにP₄濃度を測定して5ng/ml以下の低い値となったら人工授精を行う。そして、人工授精後19日目ぐらいから毎日あるいは一日おきにP₄濃度を測定し、再び5ng/ml以下の低い値を示したら非妊娠と判断して、数日後の発情日に再度人工授精を行う。人工授精後19日前後で5~10ng/mlであったら再検査を行ない、10ng/ml以上であれば妊娠と判断してよい。

年に一産を確実に実施するためには、このように分娩後の発情を正確にとらえ、妊娠、非妊娠を早期のうち診断することが必要である。今回使用したEIAキットでは、この点で十分利用価値があると思われる。

また、固相法を用いた測定であるため測定操作が簡易で、二抗体法と比較して測定時間が非常に短い。さらに加えて、サンプリングに手間の掛る血液中のP₄濃度測定でなく、簡便な牛乳中のP₄濃度測定であるため、約3時間で数十サンプルを測定することができる。

本研究の結果、牛乳中P₄濃度測定法による授精適期や妊否の判断法は、これまでの方法に比べより現場的かつ正確な方法であり、今後実用化に向けてその意義は十分にあると思われる。

要 約

牛乳中P₄濃度をEIAキットにより測定し早期妊娠診断への応用を試みた。

測定には13頭のホルスタイン種の乳汁を用い、人工授精日及び授精後21~24日目にサンプルを採取した。測定値を5ng/ml以下、5~10ng/ml、10ng/ml以上に分け、授精後21~24日目のP₄濃度で早期妊娠診断を行った。すなわち、5ng/ml以下では非妊娠、5~10ng/mlでは妊否不明、10ng/ml以上では妊娠であると診断した。結果、10ng/ml以上では100% (7/7) 妊娠、5~10ng/mlの間では50% (2/4) 妊娠、5ng/ml以下では100% (1/1) 非妊娠であった。5~10ng/mlの間の牛では、数日後に再検査を行ない妊否を再確認する必要があった。乳牛における早期妊娠診断を現場で行うため、このEIAキットは十分に活用できるものと考えられた。

謝辞 牛乳中プロゲステロン測定用EIAキットを提供して下さいましたアンカ製薬株式会社の川口 擁氏を始め、関係各位に深く感謝いたします。

また、本研究を遂行するにあたり、いろいろと御支援、御指導頂きました入来牧場の技官並びに職員の方々に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Cox, N. M., Thompson, F. N. and Culver, D. H.: *J. Dairy Sci.*, **61**, 1616-1621 (1978)
- 2) Heap, R. B., Gwyn, M., Laing, J. A. and Walters, R. D.: *J. Agr. Sci.*, **81**, 151-157 (1973)
- 3) Heap, R. B., Henville, A. and Linzell, J. L.: *J. Endocr.*, **66**, 239-247 (1975)
- 4) Pennington, J. A., Spahr, S. L. and Lodge, J. R.: *J. Dairy Sci.*, **59**, 1528-1531 (1976)
- 5) Singh, A. and Puthiyandy: *J. Reprod. Fert.*, **59**, 89-93 (1980)
- 6) 谷中 匡・井田享子・佐々木捷彦・湊 芳明・吉田 敏: EIAキットによる牛乳中Progesterone濃度の測定. 家畜繁殖誌, **32**, 63-68 (1986)

Summary

Progesterone-concentration in the cow milk was measured by enzyme-immunoassay to be used for an early pregnancy diagnosis.

Milk samples were collected on the day of insemination and then in 21–24 days after insemination. The animals were classified as those pregnant or non-pregnant on the basis of the respective milk progesterone levels in 21–24 days after insemination. The cows with progesterone concentrations of $< 5\text{ng/ml}$ were considered to be non-pregnant, the success-rate of pregnancy-diagnosis being 100% (1/1). In case of the cow with progesterone concentration of 5–10ng/ml the success rate of pregnancy-diagnosis was 50% (2/4), indicating a necessity for reexamination. In the cows with progesterone concentrations of $> 10\text{ng/ml}$, the success-rate of pregnancy diagnosis was 100% (7/7).

The result of this study indicated that the application of enzyme-immunoassay for milk progesterone may be a powerful tool for pregnancy-diagnosis in cow. It was simple and practical enough to be used in the field.