

EIA と RIA により測定した牛の血液中および乳汁中 progesterone 濃度

上村俊一・大中美緒

(家畜臨床繁殖学研究室)

平成4年8月10日 受理

Progesterone Profiles in Plasma and Milk Measured by Enzyme Immunoassay and Radio Immunoassay in Postpartum Dairy Cows

Shunichi KAMIMURA and Mio OONAKA

(Laboratory of Veterinary Reproduction)

緒 言

大動物の生殖器検査で一般的なのは直腸検査であるが、その客観性と診断精度には限界がある^{1, 3, 10)}。このため、直腸検査にあわせて血液中の性ステロイドホルモンを測定する内分泌学的な検討が行われている。Progesterone (以下Pと略)は、主に卵巣の黄体から分泌されるステロイドホルモンで、体内での代謝速度が早く、血液中のP濃度は黄体機能を的確に反映する。従来、血液中の性ステロイドホルモンの測定は放射免疫測定法 (radio immunoassay, 以下RIAと略) によったが、近年、酵素反応を利用する酵素免疫測定法 (enzyme immunoassay, 以下EIAと略) が開発され、血液中や乳汁中のP濃度が測定できるようになった^{2, 5, 6, 9)}。

今回、分娩前後の乳牛から毎日血液と乳汁 (全乳と脱脂乳) を採取し、それぞれのP濃度をRIAおよび2種類のEIAキットにより測定し、超音波断層装置で観察した卵巣所見と比較検討した。

材 料 と 方 法

供試牛は、ホルスタイン経産牛2頭 (290号: 2産次, 233号: 3産次) で、いずれも正常分娩であった。290号は、分娩前10日~分娩後60日目まで、233号は分娩後23日目~96日目までヘパリン加真空採血管で毎日採血し、直ちに低温遠心分離器で遠心後 (3,000rpm, 30分間)、血漿を測定まで凍結保存した。乳汁は、朝搾乳時にミルクジャーより合乳を採取し、一方は防腐剤として重クロム酸カリウムを加え冷蔵保存し、もう一方は3,000rpm, 30分間遠心後脱脂乳として凍結保存した。

EIAとして、マイクロタイタープレートを固相と

したCambridge Life Sciences製 (Cambridge, UK) Ovucheck plasma EIAキットとOvucheck milk EIAキットおよびビーズを固相としたP測定EIAキットPregtest (帝国臓器, 東京) を用いた。RIAは、牧野⁴⁾の方法に準じて行い、抗体としてウサギ抗P-3-oxim-BSA血清 (帝国臓器, 東京) を使用した。血漿中のP濃度は、Ovucheck plasma EIAキット、PregtestおよびRIAの3法で測定し、全乳中のP濃度はOvucheck milk EIAキットおよびRIAの2法で測定し、脱脂乳中のP濃度はPregtestで測定した。最終的に、6種類の測定法による血漿中や乳汁中のP濃度について、それぞれの測定間の相関を比較検討した。

超音波断層装置は、Aloka SSD-246 (アロカ, 東京) に5MHzの探触子を装着して用い、卵巣や子宮の形態を観察するとともに、ポラロイドType 667で写真撮影した。乳牛は牧草サイレージ (TDN: 65.0%, DCP: 12.5%) を主体に給与し、濃厚飼料を乳量に応じて補給した。試験期間中、乳牛の栄養摂取状況は日本飼養標準の要求量に対し、分娩直後ではTDN充足率が80%までに低下したが、290号は分娩後31日目に、233号は44日目に100%までに回復した。

結 果

それぞれの測定法における血漿中 (X_1, X_2, X_3) や全乳中 (X_4, X_5) および脱脂乳中 (X_6) のP濃度の相関関係をTable 1.に示した。血漿中P濃度では、Ovucheck plasma EIAキットとRIAの間に ($r=0.918$)、全乳中P濃度ではOvucheck milk EIAキットとRIAの間に ($r=0.860$)、有意な相関関係が得られた ($P<0.001$)。Ovucheck EIAキットに

Table 1. Matrix of simple correlation coefficients of progesterone concentrations in blood plasma and milk measured by EIA and RIA

Methods		(n)		X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅
Plasma progesterone	Ovucheck	(137)	X ₁					
	Pregtest	(69)	X ₂	0.725				
	RIA	(128)	X ₃	0.918	0.795			
Whole milk progesterone	Ovucheck	(137)	X ₄	0.889	0.639	0.843		
	RIA	(115)	X ₅	0.806	0.821	0.825	0.860	
Skim milk progesterone	Pregtest	(52)	X ₆	0.543	0.477	0.592	0.743	0.574

よる血漿中と全乳中のP濃度の間に ($r=0.889$), またRIAによる血漿中とOvucheck EIAキットの全乳中 ($r=0.843$) およびRIAによる全乳中のP濃度の間にも ($r=0.825$) 有意な相関関係が得られた ($P<0.001$). これに対しPregtestでは, 血漿中P濃度はRIAと高い相関関係にあったが($r=0.795$, $P<0.001$), 脱脂乳中P濃度は分娩後12日間の異常に高い測定値を除外してもRIAによる血漿中およ

び全乳中のP濃度と低い相関関係にあった ($r=0.592$, $r=0.574$).

卵巣所見では, 290号は分娩後8日目には前回妊娠角と反対側の卵巣に直径10mm以上の卵胞が形成され, 無発情のまま20mmまで発育し13日目に初回排卵した (Fig.1). 排卵後, 黄体の形成とともに血漿中や乳汁中P濃度が上昇し, Ovucheckではそれぞれ7.2ng/mlと30ng/ml以上, RIAでは8.2ng/mlと24.6ng/mlおよびPregtestでは2.8ng/mlと3.2ng/ml (脱脂乳中) となった. 233号は, 分娩後21日目に初回排卵し, 23日目の超音波診断により直径が20mm以上の黄体像が描出された. その際, 血漿中や乳汁中のP濃度はOvucheckでそれぞれ3.2ng/mlと12.5ng/ml, RIAで6.0ng/mlと27.8ng/mlとなった (Fig.2).

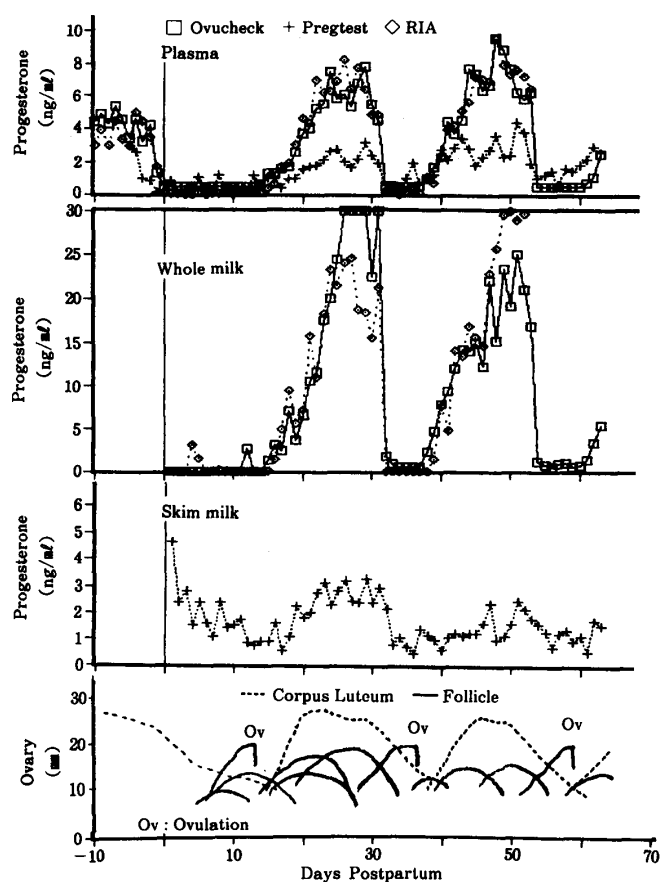


Fig. 1 Progesterone concentrations in plasma, whole milk and skim milk measured by EIA and RIA, and ovarian findings by ultrasonography in cow 290

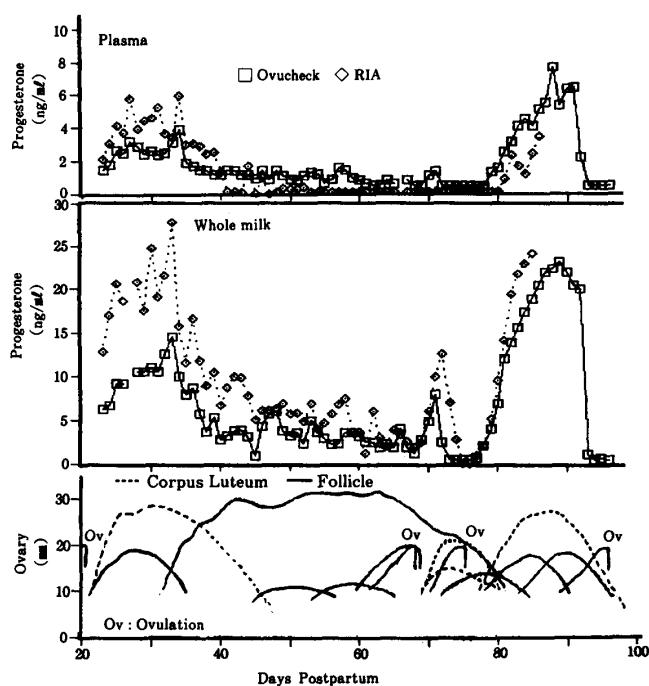


Fig. 2 Progesterone concentrations in plasma and whole milk measured by EIA and RIA, and ovarian findings by ultrasonography in cow 233

その後、32日目および39日目に他の牛に乗駕したがスタンディング発情は示さず、38日目より直径25mm以上の卵胞が存続し、卵胞嚢腫と診断された。分娩後66日目にLH-RH-A 200 μ gを投与したところ共存卵胞が排卵し、黄体が形成されたがまもなく退行し、76日目に再び排卵し、黄体の形成とP濃度の増加がみられた。

考 察

乳汁中P濃度の測定法が繁殖領域で応用されるためには、測定値の信頼性が高く、特別な施設や器具を必要とせず、操作も簡便なものでなければならない。Ovucheck plasma EIA キットは、乳汁中P測定用として開発されたEIAを血液用に改良したもので⁹⁾、無抽出で直接血液中Pを測定でき、操作も簡単で2～3時間で測定できた。Ovucheck EIA キットの測定感度は、血液で0.25ng/mlおよび乳汁で2.0 ng/mlであり、ウェル当たりでは2.5pgおよび20pgとなり、同時に行ったRIAの感度(7.5pg/ml=1.5 pg/tube)より若干劣るものの、Pregtest (11pg/tube)⁷⁾や他のEIA (10～25pg/tube)より高く²⁾、優れた検出感度を示した。Ovucheck EIA キットの血漿中Pに対する特異性では、他のステロイドとの交差率は無視できるほど小さい。従って、Ovucheck EIA キットでは測定範囲が血漿で0.5ng/ml～10.0 ng/ml、乳汁中で1.0ng/ml～30ng/mlと限界はあるものの、信頼性の高いP濃度の測定法である。

Ovucheck plasma EIA キットは、2ng/ml付近の濃度を中心に設定されており、判定基準として1ng/ml未満では機能性黄体が無く、2ng/ml以上では機能性黄体が存在する黄体期又は妊娠期と診断される。Ovucheck milk EIA キットでは全乳中のP濃度が5 ng/ml未満では機能性黄体が存在しない時期、10ng/ml以上では明らかに機能性黄体が存在する黄体期または妊娠期、5ng/ml～10ng/mlを示すものは黄体期と卵胞期の間と判定される。今回、牛における血漿中や乳汁中のP濃度は、超音波断層装置により黄体像が観察される排卵後ほぼ2日～3日目ころから増加し、次回排卵の4日～6日前に減少するなど黄体の大きさと連動した。しかし、超音波断層装置では、次回排卵日でも退行黄体が描出されるが、P濃度は極めて低く相違した。

乳汁中P濃度は、乳汁サンプルの採取時期により変動し、前搾り乳は全体乳や後搾り乳より低くなる⁸⁾。しかし、脱脂乳の場合、前搾り乳、後搾り乳

および全体乳のいずれを用いてもP濃度にほとんど差が無く、凍結保存できるなどの利点がある⁵⁾。Pregtestでは、血漿中や脱脂乳中のP濃度が1ng/ml以上を陽性(妊娠)、それ以下を陰性(非妊娠)と判定し、0.8ng/ml～1.2ng/mlでは、再測定することとなっている。今回、血漿中では黄体期にほぼ1 ng/ml以上を示したが、RIAに比べ変動し、また発情期において一過性に1ng/ml以上を示すものもあった。いっぽう、分娩直後の脱脂乳中では卵巣に機能的な黄体が無く、血漿中や全乳中のP濃度が低いにもかかわらず、1ng/ml以上の高値を示した。分娩直後の初乳は常乳に比べ高蛋白、高脂肪であり、遠心分離後、脱脂乳を採取する時点での取り扱いや、その他の要因が推察される。また、マイクロタイタープレートと比較し、試験管へのビーズの投入や攪拌などの操作が必要で、さらにアスピレーターで反応液を吸引除去する際、ビーズ表面を傷つける可能性も否定できない。このため、Pregtestでは二重検定で行うのが原則であり、またあらかじめ測定値の再現性をチェックする必要があると思われる⁷⁾。

Ovucheck EIA キットにより測定した血漿中や全乳中のP濃度は、従来のRIAと高い相関を示した。EIAは放射性同位元素を用いるRIAと異なり、測定場所に制限が無く、野外でも実施可能な診断法と思われる。また、材料の採取が容易な全乳中のP濃度は血漿中のP濃度と極めて高い相関を持つことから、酪農現場では乳用牛群検定の乳成分分析にあわせてP濃度を測定し、早期妊娠診断などに応用することが可能と思われる。

要 約

分娩前後の乳牛から血液と乳汁(全乳と脱脂乳)を毎日採取し、EIAおよびRIAにより測定したP濃度を超音波断層装置により観察した卵巣所見と比較した。EIAでは測定に要した時間は1.5～3.0時間と短く、特にマイクロタイタープレートを固相としたOvucheck EIA キットは操作も簡便であった。分娩後の乳牛における全乳中P濃度は血漿中のP濃度より高く、逆に脱脂乳中のP濃度は最も低かった。分娩後の卵巣所見は血漿中および全乳中のP濃度によく反映され、Ovucheck EIA キットとRIAとの間には有意($P<0.01$)な相関関係($r=0.806\sim0.918$)が認められた。しかし、ビーズを固相としたPregtestでは分娩後10日目頃まで機能性黄体が見られないにもかかわらず脱脂乳のP濃度が高く、また血

漿中P濃度も Ovucheck や RIA に比べ変動した。

Ovucheck EIA キットによる全乳中の P 濃度の測定は、採材が容易で測定も簡便かつ正確なことから、臨床上非常に有用である。

謝辞 本研究の遂行に御助言を頂いた農林水産省畜産試験場繁殖部第二研究室百目鬼郁男室長に深謝するとともに、薬剤の提供を頂いたデンカ製薬株式会社並びに帝國臓器株式会社に謝意を表す。

文 献

- 1) Dawson, F. L. M.: Accuracy of rectal palpation in the diagnosis of ovarian function in the cow. *Vet. Rec.*, 96, 218-220 (1975)
- 2) Hirako, M., Kariya, T. and Domeki, I.: Use of microtitre plate enzyme immunoassay kit for direct determination of progesterone in bovine blood plasma. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 33, 134-139 (1987)
- 3) Izaike, Y., Suzuki, O., Shimada, K. and Kosugiyama, M.: Ultrasonographic observation of postpartum uterine involution in beef cows. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 35, 54-59 (1989)
- 4) 牧野拓雄: 性ステロイドホルモンの Radio immunoassay. 日内分泌誌, 48, 629-646 (1973)
- 5) Nakao, T., Sugihashi, A., Tsunoda, N. and Kawata, K.: Use of milk progesterone enzyme immunoassay for differential diagnosis of follicular cyst, luteal cyst, and cystic corpus luteum in cows. *Am. J. Vet. Res.*, 44, 888-890 (1983)
- 6) Nebel, R. L., Altemose, D. L., Munkittrick, T. M., Sprecher, D. J. and McGilliard, M. L.: Comparisons of eight commercial on-farm milk progesterone tests. *Theriogenology*, 31, 753-764 (1989)
- 7) Oikawa, M., Nakao, T., Moriyoshi, M. and Kawata, K.: Reliability and practical values of polystyrene bead-solid phase EIA kit of progesterone in defatted milk from cows. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, 33, 64-72 (1987)
- 8) Pennington, J. A., Spahr, S. L. and Lodge, J. R.: Influences on progesterone concentration in bovine milk. *J. Dairy Sci.*, 64, 259-266 (1981)
- 9) Sauer, M. J., Foulkes, J. A., Worsfold, A. and Morris, B. A.: Use of progesterone 11-glucuronide-alkaline phosphatase conjugate in a sensitive microtitre-plate enzyme immunoassay of progesterone in milk and its application to pregnancy test in dairy cattle. *J. Reprod. Fert.*, 76, 375-391 (1986)
- 10) Sprecher, D. J., Nebel, R. L. and Whittier, W. D.: Predictive value of palpation per rectum vs milk and serum progesterone levels for the diagnosis of bovine follicular and luteal cysts. *Theriogenology*, 30, 701-710 (1988)

Summary

Determination of progesterone profiles in plasma and milk was executed by means of enzyme immunoassay (EIA) kits and radio immunoassay (RIA), respectively, and the ascertained results were compared with ovarian findings obtained by ultrasonography in postpartum dairy cows. Simplicity and briefness are the essence peculiar to the EIA kit procedure. The assay is to be finished within the lapse of time counting approximately 1.5 to 3.0 hours. Although the progesterone concentrations in the skim milk were noted to be lowest, those in the whole milk were significantly higher than the concentrations in plasma. Between the progesterone concentration fixed by EIA and that fixed by RIA, significantly high correlation was observed, with such ascertained counting as in the following: $r = 0.918$, $P < 0.001$ in case of the blood plasma and $r = 0.860$, $P < 0.001$ in case of the whole milk, respectively. The presence of a functional corpus luteum was indicated by the progesterone concentration fixed by EIA, with the ascertained counting of 2.0 ng/ml in case of plasma, and 10.0 ng/ml or higher than that in case of the whole milk, respectively. By the results of the present examinations it was ascertained that measuring by EIA kit may be adopted in laboratory and veterinary practices as a working method to ascertain progesterone both in plasma and in milk with sufficient sensitivity and fine precision.