

酵素免疫法を用いて測定された血液中プロジェステロン濃度 による乳牛の早期妊娠診断成績

片桐孝志^{1*}・酒井一雄¹・佐々木克典¹・安達よしえ¹・田島淳史¹・本間秀彌¹

¹ 筑波大学農林技術センター, 305-8577 茨城県つくば市天王台1-1-1

要 旨

血液中プロジェステロンの測定キット（酵素免疫法）を用いた場合における、乳牛の早期妊娠診断の精度並びにその実用性を検討した。その結果、人工授精後19, 21および23日目において本キットを用いて「陽性」と判定された場合における妊娠牛の的中率（妊娠牛/AI数）は25-36%であったのに対し、「陰性」と判定された場合における非妊娠牛の的中率（非妊娠牛/AI数）は100%であった。早期妊娠診断を行う最大の目的は非妊娠牛の早期発見であることから、本キットは、精度が高く、十分に実用的な非妊娠牛の早期発見方法であると考えられる。

キーワード：乳牛，早期妊娠診断，血中プロジェステロン，酵素免疫法

緒 言

一般に酪農経営においては、経済的に最も効率的な分娩間隔は、12ヶ月であるとされている。この目標を達成するためには優れた飼養管理技術が必要であるが、その中でも早期妊娠診断は適切な分娩間隔を保つために極めて重要である（伊藤，1995）。特に非受胎牛を早期に発見することは、その原因を究明して対策を立てるために、あるいは重点的に非受胎牛の発情観察を行い、できるだけ早く妊娠させるために重要である（森，1984）。

プロジェステロンは胚の着床、妊娠維持などの作用を司るステロイドホルモンであり、その主な分泌源は、黄体および胎盤である（加茂前，1995）。一般に正常な性周期を維持している乳牛においては、平均21日の周期で発情を繰り返す。発情期における血中のプロジェステロン値は1 ng/ml以下の低値を示す（津曲，1995）。発情終了後は、妊娠成立の有無にかかわらず卵巣に黄体が形成され、黄体において産生されたプロジェステロンが血液中に分泌される。その後、妊娠が成立した場合には黄体におけるプロジェステロン合成機能は維持され、血液中のプロジェステロンは高い値で推移する。これに対して、妊娠が成立しなかった場合、あるいは着床後に胎児が死亡した場合には黄体が退行し、それに伴い血液中プロジェステロン濃度は減少する（森，1984）。従って、乳牛では体液中のプロジェステロン濃度を測定する事を通して、間接的に黄体の機能を把握することができるため早期妊娠診断が可能になる。

従来、プロジェステロンの測定には放射免疫測定法（Radio Immunoassay法；以下RIA法と

* Corresponding Author

略す) が用いられてきたが、放射性同位体の使用には特殊な施設が必要であることなどの制限があり、現場での利用は困難であった。しかし、近年プロゲステロンの標識に酵素を用いる酵素免疫測定法 (Enzyme Immunoassay 法: 以下 EIA 法と略す) が開発された。この測定法は感度、精度、再現性とも RIA 法に劣らず、特殊な施設も不要なことから、一般に広く実施できる有用な方法である (加茂前, 1995)。

EIA 法による妊娠診断キットには体液として牛乳を用いるものと血液を用いるものが市販されている。体液として牛乳を用いる EIA キットはサンプルを採取する際の牛に対する負担はほとんどないが泌乳牛にしか利用できず、未経産牛には使用できない。一方、体液として血液を用いる EIA キットは、採血を行う必要があるため、牛に対する負担はあるものの未経産牛を含め、人工授精した全ての乳牛に使用することができる。前報においては、体液として牛乳を用いる EIA キットを用いた場合における早期妊娠診断成績を報告した (村上ら, 1996)。そこで本研究では、乳牛における早期妊娠診断法として、血液用の EIA キットを用いて、その精度並びに実用性について検討を行った。

材料および方法

本試験には、筑波大学農林技術センターで飼育されているホルスタイン種の乳牛のうち、1999年4月12日から2000年10月12日までの間に人工授精が行われた牛から採取された血液を用いた。試験期間中にはのべ60回の人工授精が行われた。供試牛の人工授精は通常通り行い、直腸検査法による妊娠診断は獣医師に依頼した。血液は、人工授精日を0日として19, 21および23日目に採取した。採血は尾静脈から行い、5 mlの真空採血管 (ヘパリン入り) に採取した。採血後60分間遠心分離 (2000rpm) を行い、分離した血漿は、測定まで凍結保存した。検体の融解は、室温で行い攪拌後に供試した。測定は EIA のキット (オブチェック血液用 EIA キット: デンカ製薬) を用い定性的に判定した。判定は標準液と検体の発色度合いを比較し、検体中のプロゲステロン濃度から、キットに添付されている判定表 (表1) に準じて行った。

結 果

本試験期間中に実施されたのべ60回の人工授精のうち、人工授精後35日目以降に獣医師による妊娠診断 (直腸検査法) の結果妊娠していた乳牛は、13頭であった。EIA 法を用い、人工授精後19, 21および23日目に「陽性」および「陰性」と判定された牛をそれぞれ妊娠および非妊娠と見なし妊娠診断を行った結果、並びに獣医師の妊娠診断で得られた結果を表2に示した。

EIA 法を用いて人工授精後19, 21および23日目に妊娠と診断された場合における妊娠牛の的中率および例数はそれぞれ25.0% (13/52), 31.0% (13/42) および36.1% (13/36) であった。妊娠していた13頭は、人工授精後19, 21および23日目における EIA 法による判定がい

表1 プロゲステロン濃度による診断基準

検体の発色度	プロゲステロン濃度	判定	妊娠診断
標準液の発色よりも淡い場合	高	+	妊娠
標準液の発色と同じか濃い場合	低	-	非妊娠

ずれも「陽性」であった。妊娠が成立している場合、人工授精後採血までの日数が進むにしたがって、「陽性」と判定された牛の例数は減少したが、逆に妊娠牛の的中率は高くなり、23日目において最高であった。

非妊娠牛の場合、EIA法で「陰性」と判定されたものは全て獣医師の妊娠診断でも非妊娠であり、人工授精後19、21および23日目における非妊娠牛の的中率はそれぞれ100% (8/8)、100% (18/18) および100% (24/24) であった。また採血日が進むにしたがって、EIA法で「陰性」と判定された例数は増加した。その結果、EIA法で「陽性」および「陰性」と判定された場合を合計した場合における総合的な妊娠診断の的中率および例数は、それぞれ35.0% (21/60)、51.7% (31/60) および61.7% (37/60) であった。妊娠の場合と同様に、採血日が進むにしたがって、妊娠診断の的中率は高くなり、23日目において最高であった。

次に、採血した3日間のEIA法の妊娠診断を分類し、その例数および妊娠、非妊娠の例数を表3に示した。人工授精後19、21および23日目における判定のいずれもが「陽性」であったにもかかわらず非妊娠である場合も多かったため、妊娠牛の的中率および例数は38.2% (13/34) と低かった。また、3日間の採血期間中1回でもEIA法で「陰性」と判定されたものは、全て非妊娠であった。

表2 各採血日の診断結果および精度

診断および的中率		人工授精後の採血日		
		19日目	21日目	23日目
妊娠	EIA法で+の判定 (例数)	52	42	36
	獣医師の最終診断 (例数)	13	13	13
	妊娠的中率 (%)	25.0	31.0	36.1
非妊娠	EIA法で-の判定 (例数)	8	18	24
	獣医師の最終診断 (例数)	8	18	24
	非妊娠的中率 (%)	100.0	100.0	100.0
全体	EIA法での判定 (例数)	60	60	60
	獣医師の最終診断 (例数)	21	31	37
	総合的中率 (%)	35.0	51.7	61.7

表3 EIA法による判定の分類および妊娠、非妊娠の例数

分類	全体 (例数)	妊娠 (例数)	非妊娠 (例数)
+++	34	13	21
++-	8	0	8
+ - +	1	0	1
+ - -	9	0	9
- - +	1	0	1
- - -	7	0	7
合計	60	13	47

注) 分類は、左から19、21、23日目の判定である。

考 察

本試験の結果から、EIA法で「陽性」と判定された場合における妊娠牛の的中率は、最高で36.1%と低い値に留まったが、「陰性」と判定された場合における非妊娠牛の的中率は100%であった。これは、人工授精後19、21および23日目における判定がいずれも「陽性」であっても、実際には非妊娠の例が多数存在したためである。乳牛では、通常授精した卵の25~40%の割合で早期胚死滅が起こり(森, 1996)、胚がAI後11~13日齢以降に死滅すると、発情の回帰が遅延し発情間隔が延長することが報告されている(加茂前, 1995)。従って、本試験において人工授精後19、21および23日目において「陽性」と判定された場合の中には、採血後に胚が死滅したケースが含まれている可能性がある。

また、一般に乳牛では発情間隔が平均より3日程度前後にずれることも多く(村上ら, 1996)、さらに黄体遺残の場合のように妊娠していないにもかかわらず、何らかの理由で通常よりも長く黄体が存続し、血液中プロゲステロン濃度が高く維持される可能性も考えられる(加茂前, 1995, 津曲, 1995)。従って、本試験においても様々な理由により発情間隔が遅延したために、人工授精後19、21および23日目に採取された血液を用いたEIAによる判定結果が「陽性」と判定された場合が含まれている可能性も考えられる。

以上の結果から、人工授精後19、21および23日目におけるEIAによる妊娠診断結果のいずれもが「陽性」であっても、本方法を用いた判定からだけでは、妊娠牛を判定することは不可能である。そのため、最終的な妊娠診断は、人工授精35日以後に獣医師による直腸検査法での胎膜の触診による診断が必要である。

一般に、早期妊娠診断を行う目的は、受胎牛と非受胎牛を区別することである。本EIAキットを用いた早期妊娠診断は、AI後21日前後の段階で「非妊娠牛」を検出するためには極めて精度が高く、実用的であると考えられる。

また、採血日が進むにしたがって、EIA法で「陽性」と判定された例数が減少し、「陰性」と判定される例数が増加し、その結果、妊娠牛の的中率および総合的中率が高くなった。これは人工授精後19日目における判定結果が「陽性」であっても、21日目および23日目の何れか又は両方において「陰性」と判定された乳牛が多く認められたためである。先に述べたとおり、乳牛では、発情間隔が平均より3日程度変動することも多く(村上ら, 1996)、これらの乳牛は、発情間隔が平均よりやや長くなったものと推測された。

以上の結果から、本試験で用いた血液中のプロゲステロン濃度を指標とするEIAキットを用いた早期妊娠診断法は、非妊娠牛を検出するためには十分に実用的な補助的手段であることが明らかになった。また、個体により発情間隔が多少ずれることも多いため、人工授精後19、21および23日目の3回の測定を行うことにより、安定した妊娠診断結果が得られると考えられる。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、妊娠診断を行っていただいた、獣医師の後藤正雄氏に、深く感謝の意を表します。

引用文献

- 伊藤 晃 1995. 明日の酪農へのアプローチ, 酪農事情651: 51-56
- 加茂前秀雄 1995. 雌の不妊症, 森 純一・金川弘司・浜名克己編集, 獣医繁殖学, 文永堂, 東京, 253-320
- 村上信行・川鍋芳郎・岡田一男・伊藤 睦・本間秀彌・田島淳史 1996. 乳汁中プロゲステロンの簡易測定キットを用いた泌乳牛の早期妊娠診断法の実用性に関する研究, 筑波大学農林技術センター研究報告9: 21-26
- 津曲茂久 1995. 妊娠と分娩, 森 純一・金川弘司・浜名克己編集, 獣医繁殖学, 文永堂, 東京, 178-182.
- 森 純一 1984. 妊娠中の内分泌および代謝, 望月公子編, 家畜繁殖学全書, 朝倉書店, 東京, 264-273.
- 森 純一 1996. 妊娠, 田先威和夫監修, 新編畜産大事典, 養賢堂, 東京, 611-615

Early Pregnancy Diagnosis Using an Enzyme-Immuno Assay Kit for Blood Progesterone in Dairy Cattle

Takashi KATAGIRI^{1*}, Kazuo SAKAI¹, Katsunori SASAKI¹,
Yoshie ADACHI¹, Atsushi TAJIMA¹ and Hideya HOMMA¹

¹ Agricultural and Forestry Research Center, University of Tsukuba, Ten-noh Dai 1-1-1
Tsukuba, Ibaraki 305-8577, Japan

Abstract

Accuracy of the early pregnancy diagnosis using an enzyme-immuno assay kit (EIA kit) for blood progesterone was evaluated in dairy cattle.

When the pregnancy diagnosis were carried out using an EIA kit for blood progesterone at 19, 21 or 23 days after artificial insemination, the accuracy of diagnosis for pregnancy (number of pregnant cattle/total number of AI) and non-pregnancy (number of non-pregnant cattle/total number of AI) were 25-36 % and 100 %, respectively.

It was concluded from the present study that early pregnancy diagnosis using an EIA kit for blood progesterone is a practical and accurate means of detecting non-pregnant dairy cow.

Keywords : Dairy cattle, Early pregnancy Diagnosis, Blood progesterone, Enzyme Immunoassay.

* Corresponding Author