

# Plasma/Serum Progesterone ELISA Kitによるウマ血中プロジェステロンレベルの測定

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者名	角田,修男 秋田,博章 宮澤,清志 大崎,和栄 佐藤,邦忠 原,啓二 川口,擁 岩間,克美
発行元	日本獣医師会
巻/号	42巻11号
掲載ページ	p. 759-762
発行年月	1989年11月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター  
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council  
Secretariat



## Plasma/Serum Progesterone ELISA Kit

## によるウマ血中プロジェステロンレベルの測定

角田修男\*<sup>1)</sup> 秋田博章\*<sup>1)</sup> 宮澤清志\*<sup>2)</sup> 大崎和栄\*<sup>2)</sup>佐藤邦忠\*<sup>2)</sup> 原 啓二\*<sup>3)</sup> 川口 擁\*<sup>4)</sup> 岩間克美\*<sup>4)</sup>

(平成元年 9 月 22 日受理)

Progesterone Levels in the Serum of Mares Determined by Progesterone ELISA Kit  
 NOBUO TSUNODA (Shadai Farm Hayakita, Hayakita-Cho, Yufutu-Gun, Hokaido 059-14),  
 HIROAKI AKITA, KIYOSHI MIYAZAWA, KAZUE OOSAKI, KUNITADA SATO, KEIJI HARA, MAMORU  
 KAWAGUCHI and KATUMI IWAMA

## SUMMARY

A commercial Kit (OVUCHECK Plasma/Serum ELISA Kit, Cambridge Life Sciences, England) designed to measure the concentration of progesterone using an enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) has been assessed for measuring progesterone in the serum of mares.

Maximum time required for the entire procedure was 3 hours. The range of progesterone levels measurable by this kit was 0.5 to 10.0 ng/ml serum and correlation between the results by this method and those of RIA was significant ( $r=0.87$ ,  $P<0.01$ ). The intra-assay and inter-assay coefficients of variation were 10.9~12.8% (1.6~7.8 ng/ml,  $n=10$ ) and 8.7~16.5% (0.2~4.4 ng/ml,  $n=10$ ), respectively.

Changes in the circulating levels of the progesterone can be detected by the Kit; in particular, low concentrations during the follicular phase and the subsequent rise during the luteal phase of the oestrous cycle have been determined.

—J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 42, 759~762 (1989).

## 要 約

ウマの血中プロジェステロンの測定に、OVUCHECK Plasma/Serum Progesterone ELISA Kitの応用を試みた。

ホルモン測定の全操作は3時間で終了し、測定範囲は0.5~10.0ng/ml serum、測定内変動係数は10.9~12.8% (1.6~7.8 ng/ml  $n=10$ )、測定間変動係数は8.7~16.5% (0.2~4.4 ng/ml  $n=10$ )、ならびにRIAとの相関係数は $r=0.87$  ( $n=22$ ,  $P<0.01$ )であった。

OVUCHECK Kitにより求めたホルモン値は、発情周期中の卵巣機能を良く反映し、妊娠診断にも応用可能であることが認められた。

\*<sup>1)</sup> 社台ファーム早来 (北海道勇払郡早来町)

\*<sup>2)</sup> 帯広畜産大学畜産学部 (北海道帯広市稲田町)

\*<sup>3)</sup> 帯広食肉検査事務所 (北海道帯広市西25条北2丁目)

\*<sup>4)</sup> 株式会社 デンカ製薬 (神奈川県川崎市川崎区中瀬3-19-11)

**Key Words:** ELISA-Kit, ウマウマ血中プロジェステロン値, 発情周期, 妊娠診断, ホルモン測定.

ウマの受胎率・生産率は、他の家畜のそれらと比較して著しく低く、この原因の1つは種付け適期の判定が困難であるためといわれる。

近年、分析化学の進歩により、ステロイドホルモン測定はラジオアイソトープ(牧野)<sup>2)</sup>、ないし酵素(NAKAO)<sup>3)</sup>を用いて、抗原・抗体反応の特異性を利用した高感度の微量定量法が開発され、プロジェステロン測定に関してはウマないしウシの発情鑑定・妊娠断法(SATOら)<sup>7)</sup>、

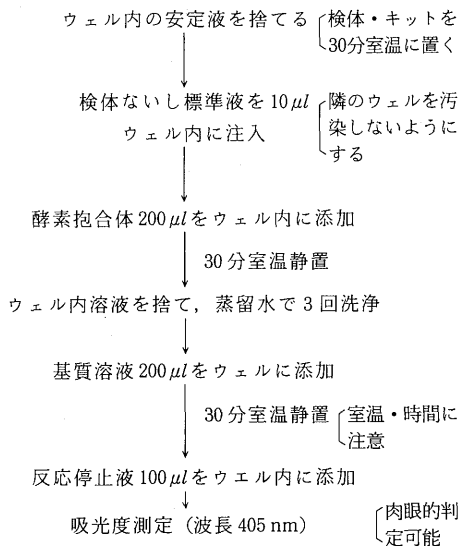
竹内ら<sup>10)</sup>), ならびに卵巣機能検査法(角田ら<sup>11)</sup>, NAKAO<sup>4)</sup>, 及川ら<sup>5)</sup>)などに広く応用されている。

しかし, ラジオアイソトープを用いる方法は微量の試料について高い感度・精度でホルモン測定が行える反面, 放射性同位元素を使用するための特別な放射線使用施設が必要であり, さらにアイソトープの使用に際しては放射線障害防止や汚染防止の点から厳しい法的制約を受けている。そこで, 今回は SAUER ら<sup>8)</sup>が開発したマイクロプレートにプロゲステロン抗血清を固相化したキットを ECKERSALL and HARVEY<sup>1)</sup>に従って, ウマ血中プロゲステロンレベルの測定を試み, 臨床応用への検討を加えた。

### 1. 方 法

ウマ血清中プロゲステロン値は, 「OVUCHECK Plasma/Serum ELISA Kit」(Cambridge Life Sciences 社製, イギリス:以下 OVUCHECK Kit)を用いて行った。OVUCHECK Kit の内容は次のとおりである。

- 1) プロゲステロン抗体付着マイクロタイターウェル\*: 96 ウェル
- 2) 酵素抱合体 (アルカリ性フォスファターゼ標識プロゲステロン抱合体): 25 ml
- 3) 基質錠剤 (パラニトロフェニールフォスファターゼ 40 mg/錠)\*\*: 3 錠



注) 定量測定: 半対数グラフ上の対数目盛りに各標準液の濃度を, 他方に吸光度を取り検量曲線を作成する

図1 OVUCHECK Plasma/Serum Progesterone EIA Kit 操作法

- 4) 基質溶解緩衝液 [1 M ジエタノールアミンと 0.5 mM 塩化マグネシウム (pH 9.8)]: 25 ml
- 5) 反応停止液 [0.5 M オルトリン酸 1 水素 2 カリウムと 5 mM エチレンジアミン四酢酸 (pH 10.0)]: 20 ml
- 6) 標準液: プロゲステロンを 0.5, 1.0, 5.0 と 10.0 ng/ml 含有する標準ウシ血清

\*: マイクロタイターウェルには, 安定用緩衝液が入っている。使用に際し安定液を捨て, ウェルを激しく振ってウェル内に液が残らないようにする。

\*\* : 基質錠剤は, 溶解後 2 ~ 8 °C で 1 週間安定である。また, -20 °C 以下では 3 カ月間安定であり, 凍結保存後溶解しても活性は失われない。

OVUCHECK Kit を用いての, 血中プロゲステロン測定操作は図1に示した。酵素反応停止後の吸光度は, 島津 UV-160 型に超マイクロセルを付け読み取り, 半対数グラフに添付標準液のホルモン量を対数目盛で記入し, 検量曲線を作成 (図2), 試料中のプロゲステロン値を算出した。

### 2. 結 果

OVUCHECK Kit のホルモン測定値について, 次の項目を検討した。

#### 1) 盲 検 値

蒸留水を用いて 20 重測定し, 0.5 と 1.0 ng/ml の標準曲線を仮想延長し求めたプロゲステロン値を盲検値とすれば, 19.8 ± 4.6 pg/ml となった。

#### 2) 測 定 値 の 再 現 性

プロゲステロン値の異なる試料についての測定内変動係数は, 同一試料を 10 重測定した結果, 1.6 ng/ml で 12.8%, 7.8 ng/ml で 10.9% であった。さらに, 測

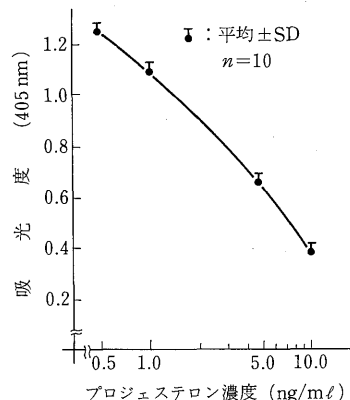


図2 OVUCHECK Plasma/Serum Progesterone ELISA Kit によるプロゲステロン測定用標準曲線

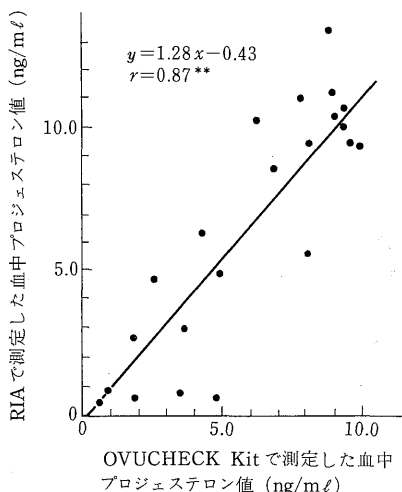


図3 OVUCHECK Plasma/Serum Progesterone ELISA-KitとRIAで測定したウマ血中プロジェステロン値の相関関係

日間変動は同一試料については3重測定を10回繰り返して求めたところ、1.0 ng/mlで16.5%、4.4 ng/mlで8.7%であった。

### 3) RIA法との相関関係

牧野<sup>2)</sup>のRIA法に従って、60試料中のプロジェステロン値を3重測定し、同一試料についてOVUCHECK Kitで2重測定し求めたプロジェステロン値の母分散が両測定法間で等しいという仮説を否定できなかったので、回帰方程式と相関係数を求めた ( $P < 0.01$ )。回帰係数の直線性に有意性が認められ ( $y = 1.28x - 0.43$ )、さらに両測定法の相関性は強かった ( $r = 0.87$ ,  $n = 22$ ,  $P < 0.01$ , 図3)。なお、今回の相関性検定ではOVUCHECK Kitで0.5 ng/ml以下ならびに10.0 ng/ml以上の成績は削除して検定を行った。

## 3. 臨床的検討

十勝管内ならびに胆振管内で繁殖用に繋養中の雌馬46頭(年齢4~9歳)について、OVUCHECK Kitにより血中プロジェステロン値を求めた。

### 1) 発情期と黄体期の比較

試情、臨床検査(膣・直腸検査)の所見から、発情徴候を認めた32頭を用いた。排卵確認当日(排卵日を0日目として発情周期を起算)と排卵後7~10日目の2回、頸静脈より血液を採取し、OVUCHECK KitとRIA法によりプロジェステロン値を求めた。その結果、発情期のプロジェステロン値は  $0.67 \pm 0.35$  ng/ml :  $0.56 \pm 0.26$  ng/ml (OVUCHECK Kit : RIA) であり、黄体期は  $8.73 \pm 3.07$  ng/ml :  $8.09 \pm 2.42$  ng/ml と、発情期ならびに黄体期のプロジェステロン値には測定方法

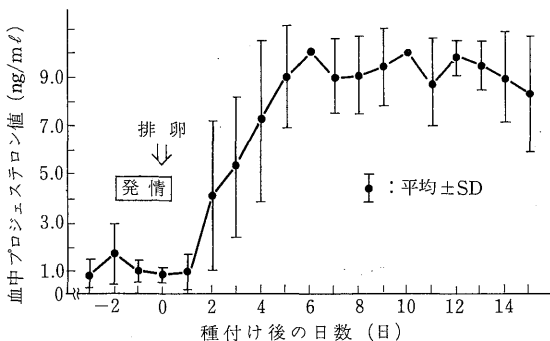


図4 OVUCHECK Plasma/Serum Progesterone ELISA Kitによるウマ種付け前後の血中プロジェステロン値の消長

間で有意差は認められなかった。

さらに、プロジェステロン値から発情期(1.0 ng/ml未満)と黄体期(1.0 ng/ml以上)にわけ、両測定方法の判定成績を比較した。その結果、求めたホルモン値での判定が一致しなかったのは370回の総測定中6回(1.6%)、検体数では2例(2/37 = 5.4%)であった。なお、この例はいずれも発情期の試料であり、RIAでは低値であったにもかかわらず、OVUCHECK Kitでは1.0 ng/ml以上の高いプロジェステロン値を示した。

### 2) プロジェステロン値の発情周期中の変化

発情周期中のホルモン値の消長を調べるため、10頭の雌馬から排卵3日前から排卵後15日目まで1日1回採血し、OVUCHECK Kitにより血中プロジェステロン値を求め図4に示した。測定結果は、発情徴候の見られる間は2.0 ng/ml以下で推移し、排卵2日目から5日目にかけて急激に増加し、以後排卵15日目まで8.0 ng/ml以上の高値を示した。

### 3) 妊娠診断

発情徴候(試情、膣・直腸検査)から種付けを行った20頭について、排卵0日目と排卵20~22日目の2回、OVUCHECK Kitにより血中プロジェステロン値を求め、さらに超音波画像所見で排卵・胎胞を確認した。これらの結果、発情徴候・排卵を認めた(発情期)20頭中2頭は血中プロジェステロン値が1.0 ng/ml以上であった。なお、この2頭は以後の検査で不妊娠であった。

血中プロジェステロン値による妊娠診断を、排卵後20~22日目に行った。その結果、20頭中4頭は発情徴候が不明瞭であり、卵巣に4.5 cmの卵胞が認められ、血中プロジェステロン値が1.0 ng/ml未満、膣・直腸検査と超音波画像所見で胎胞が確認されないなどのことから不妊娠と診断した。発情徴候が認められず、血中プロジェステロン値が1.0 ng/ml以上の16頭中14頭の超音波画像所見には胎胞が認められ妊娠と診断した。残りの2頭は、胎胞が確認できず不妊娠と診断したので、

妊娠診断の適中率は不妊馬では4/4 (100%), 妊娠馬では14/16 (87.5%)で、全体としての診断の適中率は90% (18/20頭)であった。

#### 4) OVUCHECK Kitの肉眼的定性判定

OVUCHECK Kitの測定操作で、反応停止液を添加する直前に標準液(プロゲステロン量1.0 ng/ml, OVUCHECK Kitに添付)と比色し、60検体について肉眼的に試料中のホルモン値を判定した。この結果、発情期の30検体はすべてホルモン値が1.0 ng/ml未満であり、また黄体期の30検体すべてについて1.0 ng/ml以上と肉眼で判定でき、定量成績とよく符合した。

### 4. 考 察

#### 1) 基礎的検討

OVUCHECK Kitの検量曲線は、0.5～10.0 ng/mlの範囲ではほぼ直線的に変化し、盲検値が19.8 pg/mlと低値であり、臨床面での応用に満足できる方法と考える。

測定値の再現性について、ウシの乳汁で竹内ら<sup>10)</sup>は測定内変動係数が7.3～8.2%、ウマの血液でECKERSALLとHARVEY<sup>1)</sup>は14.6～16.9%と報告している。さらに、測定間変動係数についてウシの乳汁で5.2～9.1% (竹内ら<sup>10)</sup>、15.4% (安原)<sup>12)</sup>、ウマの血液について10.2～13.1% (ECKERSALL & HARVEY)<sup>1)</sup>と類似した成績であった。さらに、標準液はウシ血清が使用されているが、OVUCHECK Kitの再現性・精度からウマ血中プロゲステロン測定に応用できると考える。

また、OVUCHECK KitはRIAとの相関係数に有意性が認められ、ラジオアイソトープを使用しないため、特別の施設・測定器機を必要とせず、感度・精度の高い操作の簡易なプロゲステロンの測定法と考える。ただ、OVUCHECK Kitでプロゲステロンが高値であった2例について今回は十分な臨床所見が得られていないので、今後例数を増やし原因を解明したいと考えている。

#### 2) 臨床的検討

ウマ発情周期中の血中プロゲステロン値の消長について、佐藤ら<sup>6)</sup>とSATOら<sup>7)</sup>は排卵後4日目から排卵後15日目までは高値を維持すると述べている。今回の成績のうち発情期・黄体期の比較、ならびに発情周期中のプロゲステロン値の消長は諸家らの報告と類似した成績であり、OVUCHECK Kitによる黄体機能の判定は卵巣疾患の診断・受精卵移植に供用するウマの選定などに積極的に応用できると考える。

妊娠診断を行った20頭について、排卵0日目に血中プロゲステロン値が1.0 ng/ml以上であった2頭は発情徴候を認め種付けを行っている。STABENFELDTら<sup>9)</sup>は、ウマの発情期に血中プロゲステロン値が高い

例、ないし黄体期にも排卵を認めているが受胎との関係は不明であると述べている。今回の例は不妊であったが、その原因については十分検査を行っていない。さらに、排卵後20～22日目に血中プロゲステロン値が1.0 ng/ml未満の例は、卵巣に4.5 cm以上の卵卵が触知され、超音波所見で胎胞が認められなかったことから、発情期であると判断した。

また、排卵20～22日後の血中プロゲステロン値が1.0 ng/ml以上を示した例のうち、超音波画像所見で胎胞が認められなかった不妊の2頭について、その理由は不明である。しかし、OVUCHECK Kitの適中率を高めるためには、予定発情日にプロゲステロン値が1.0 ng/ml以上の例は排卵後7～10日目の間で再検査をするか、試情、臨床所見を注意深く観察すべきである。なお、不妊の例は早期に診断可能であり、肉眼的な定性試験がよく定量成績と一致したことから、排卵後18日目頃の黄体機能の判定にOVUCHECK Kitは有用な方法であると考えられる。

今回、OVUCHECK Kitを用いたウマ血中プロゲステロン測定法について、臨床応用の可能性について検討を行った。その結果、測定操作が簡便であり、0.5～10.0 ng/mlの範囲では測定成績の信頼性が高い方法であることを認めた。さらに、肉眼的半定量成績による発情鑑定・妊娠診断など、卵巣の黄体機能判定のために臨床応用可能な方法であると考えられる。

### 引用文献

- 1) ECKERSALL, P. D. and M. J. A. HARVEY: *Vet. Rec.*, 120, 5～8 (1987).
- 2) 牧野拓雄: 日内分泌誌, 49, 629～645 (1973).
- 3) NAKAO, T.: *Acta Endocrinol.*, 93, 223～227 (1980).
- 4) NAKAO, T.: *J. Coll. Dairying.*, 9, 165～207 (1980).
- 5) 及川 大, 中尾敏彦, 森好政晴, 河田啓一郎: 家畜繁殖誌, 33, 64～72 (1987).
- 6) 佐藤邦忠, 三宅 勝, 吉川友喜, 神戸川 明: 家畜繁殖誌, 21, 113～1115 (1975).
- 7) SATO, K., M. MIYAKE, T. YOSHIKAWA and A. KAMBEGAWA: *Equine Vet. J.*, 9, 57～60 (1977).
- 8) SAUER, M. J., J. A. FOULKES and P. M. O' NEILL: *Br. Vet. J.*, 138, 522～532 (1982).
- 9) STABENFELDT, G. H., J. P. HUGHES, J. W. EVANS and D. P. NEELY: *Equine Vet. J.*, 6, 158～163 (1974).
- 10) 竹内公志, 中尾敏彦, 森好政晴, 河田啓一郎: 日獣会誌, 40, 95～99 (1987).
- 11) 角田修男, 佐藤邦忠, 三宅 勝: 北獣会誌, 23, 345～349 (1979).
- 12) 安原稔夫: 北獣会誌, 27, 99～101 (1983).