

牛血漿中Progesterone測定用EIAキット(Ovucheck)の実用性についての検討

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者	田中, 樹竹 中尾, 敏彦 河原, 隆人
巻/号	41巻2号
掲載ページ	p. 83-87
発行年月	1988年2月

牛血漿中 Progesterone 測定用 EIA キット (Ovucheck) の実用性についての検討

田中樹竹* 中尾敏彦* 河原隆人* 森好政晴* 河田啓一郎*

(昭和 62 年 10 月 16 日受理)

A Plasma Progesterone Enzyme Immunoassay Kit Used for Heifers
SHIGETAKE TANAKA, TOSHIHIKO NAKAO, TAKATO KAWAHARA, MASAHARU MORIYOSHI
and KEIICHIRO KAWATA (School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen
University, Ebetsu, Hokkaido 069)

SUMMARY

An enzyme immunoassay (EIA) kit of plasma/serum Progesterone (P) (Cambridge Life Science Ltd., U.K.) was evaluated for practical use in bovine reproduction. The measurable range of plasma P was between 0.6 and 10.0 ng/ml. Intra-assay coefficients of variation (CVs) ($n=6$) of plasma P levels from three pooled plasma samples were 11.9% (mean=1.11 ng/ml), 11.6% (2.25 ng/ml) and 7.4% (6.07 ng/ml). The inter-assay CVs of P levels from other pooled samples were 22.4% (0.86 ng/ml), 25.2% (2.22 ng/ml) and 17.8% (6.39 ng/ml). The time required for the whole procedures was within 2 hours. A significantly high correlation ($r=0.903$, $P<0.005$, $n=27$) was observed between P levels determined by this kit and the values obtained by a double antibody EIA.

The early pregnancy diagnosis of heifers based on P levels 22-24 days after insemination showed an accuracy rate of 100% (14/14) for negative results and 60.9% (25/41) for positive cases. The P levels estimated by this kit was also useful for a differential diagnosis of anestrus cows with a functional corpus luteum and those with inactive ovaries.

The plasma P EIA kit may be successfully applied to heifers as a tool of reproductive management and a diagnostic aid for ovarian dysfunction.

要 約

牛の血漿および血清中 progesterone (P) 濃度を簡易的に測定できるキット (Ovucheck Plasma/Serum P EIA Kit) の実用性について検討した。

本キットによる血漿中 P 測定最少限度濃度は 0.6 ng/ml, 測定内および測定間変動係数は, それぞれ, 7.4~11.9% および 17.8~25.2% であった。測定所要時間は 2 時間である。本キットと二抗体法 EIA による同一サンプルの P 測定値の間には高い相関 ($r=0.903$, $P<0.005$, $n=27$) が認められた。

本キットにより AI 後 22~24 日目の血漿中 P を測定し, 早期妊娠診断を行ったところ, 非妊娠判定例で 100% (14/14), 妊娠判定例では 60.9% (25/41) の適中率が得られた。また, 血漿中 P 測定は無発情牛の卵巣疾患の鑑別にも有用であった。

本キットによって臨床応用に適した信頼性の高い血漿中 P 濃度の測定が可能であると判断された。

血液中の progesterone (P) 濃度の測定は, 主として黄体から分泌される P の量を推定する有力な手段となる。したがって, 一定期間継続して定期的に血液中 P を測定すれば, この間の黄体形成, 持続または退行などを正確に知ることができるし, また, 発情周期や臨床所見があ

る程度明らかな場合は, 1 回のみ測定でも卵巣機能に関する情報を得ることができる。牛の繁殖領域においても, 血漿または血清中 P 測定は発情鑑定^{7,9}, 妊娠の診断^{16,17}, 卵巣疾患の診断^{2,18}および胚早期死滅の診断^{1,4,15}などに応用が可能なが報告されているが, 臨床面においては, 未だ日常的な検査手段とはなっていない。この理由の一つとしては, これまで, 血漿・血清中 P を

* 酪農学園大学酪農学部 (北海道江別市文京台緑町 582-1)

簡便にしかも短時間で測定できる実用的な方法がなかったことがあげられる。

近年、乳牛では、血液よりも採取が容易な乳汁の P 濃度を簡便に測定できる enzyme immunoassay (EIA) キットが市販されるようになり、わが国でもすでに応用が始められている^{8,14,21,22,24)}。これらのキットの中には、血漿・血清中の P 測定も応用できるものもあるが^{6,8,24)}、いずれも抽出操作が必要であり、臨床応用上操作が煩雑過ぎるという嫌いがある。

今回、著者らは、血漿・血清中 P を抽出操作なしで直接測定できる EIA キット (Ovucheck Plasma/Serum Progesterone EIA Kit, Cambridge Life Science 社, 英国) について、測定の信頼性および臨床的応用価値を検討した。

1. 材料および方法

1) EIA キット

本キットは、先に報告した²¹⁾ Ovucheck Milk P EIA kit の姉妹品ともいえるもので、P 測定原理およびキットの内容などはほぼ同じである。相異点は、標準乳汁の代わりに標準血漿 (P 濃度: 0.5, 1, 5, 10 ng/ml) が添付されていることである。

2) 測定操作

測定操作は Milk P-EIA Kit²²⁾ の場合と同じである。測定に要する時間は約 2 時間である。

吸光度の測定には、マイクロプレート用光度計 (Immuno Reader NJ-2000, 日本インターナード株式会社) を用いた。この光度計における吸光度の表示範囲は 0~2.999 で、直線範囲は 0~2.000 (ABS \pm 2%) である。

3) 測定値の信頼性の検討

(1) 供試血漿: 酪農学園元野幌農場で飼育されているホルスタイン種未経産牛群のうち、12~14カ月齢の牛 27 頭から、発情周期の時期に関係なく血液を採取した。すなわち、18 G 採血針とガラス製ヘパリン加真空採血管 (5 ml 用) を用いて、正中尾静脈より約 5 ml の血液を採取した。得られた血液はただちに 4°C に保存して研究室に持ち帰り、採血後 1 時間以内に遠心分離 (3,000 rpm, 10 分間) し、血漿を他の小試験管に移してから、測定に供するまで -20°C で凍結保存した。

(2) 測定感度: 標準血漿中の P を 6 回反復測定し、各々の吸光度の平均値に基づいて標準曲線を作成した。そして、本キットには、標準 P 0 ng/ml が備わっていないため、最少標準 P 0.5 ng/ml における吸光度の平均値から標準偏差の 2 倍の値を差し引いた吸光値に対応する P 濃度 (測定最少限量) を標準曲線から求め、これをもって測定感度とした。

(3) 測定値の再現性: P 濃度の異なる 3 種類のプール血漿について、それぞれ 6 回反復測定を行い、測定内変

動係数 (CV) を求めた。また、別に作成した 3 種類のプール血漿を用いて測定間 CV を求めた。

(4) 二抗体法 EIA による P 測定値との相関: 血漿 27 検体について、P 濃度を本キットと二抗体法 EIA¹¹⁾ により測定し、両測定値間の相関を求めた。

(5) 血液採取から血漿分離までの保存温度と時間が P 測定値に及ぼす影響: 黄体期の未経産牛 2 頭から採取したヘパリン加血液を 4°C または室温 (25°C 前後) に保存し、それぞれ、採血の直後、1, 2, 3, 4, 6 および 12 時間後に遠心分離して得られた血漿について P 濃度を測定した。

4) 臨床応用

(1) 早期妊娠診断: 元野幌農場のホルスタイン種未経産牛のうち、60 年 11 月から 61 年 7 月の間に人工授精 (AI) された 55 頭について、AI 後 22~24 日目 (原則として 23 日目) に採血し、血漿中 P 濃度を測定した。妊娠、非妊娠の確認は、AI 後 40 日目以降に実施した直腸検査によった。AI 後 22~24 日目の血漿中 P 値が 1.0 ng/ml 以上の例を妊娠¹⁹⁾、それ未満を非妊娠と判定し、その後の直腸検査の結果から適中率を求めた。

(2) 無発情牛の卵巢疾患の鑑別: 同じ未経産牛群において、60 年 11 月から 62 年 4 月の間に無発情の稟告で上診された 25 頭について採血し、血漿を分離して保存し、後日 P 測定に供した。採血後、直腸検査により機能性黄体を有すると判定された例には、PGF_{2 α} 類似体、クロプロステノール (エストラメイト, 英国 ICI 社) を 500 μ g 筋肉内注射した。また、直腸検査上明瞭な卵胞も黄体も認められないことから、卵巢静止と判定された例には GnRH 類似体、酢酸フェルチレリン (コンセラー, 武田薬品工業株式会社) を 100 μ g 筋肉内注射した。

この時の直腸検査による黄体の有無の判定が、どの程度正確に行われているかを検討するために、血漿中 P 値による黄体の有無の判定結果と比較した。すなわち、P 値が 1.0 ng/ml 以上のものを機能性黄体を有する例²¹⁾、1.0 ng/ml 未満を卵巢静止例と判定した。

2. 成績

1) 本キットによる P 測定値の信頼性

(1) 測定感度: 本キットによる血漿中 P 測定のための標準曲線の 1 例を図 1 に示した。最少標準 P 量 (0.5 ng/ml) との関連で求めた。本キットによる測定可能最少 P 濃度 (測定感度) は 0.6 ng/ml であった。

(2) 測定値の再現性: P 濃度の異なる 3 種類のプール血漿における P の測定内 CV (N=6) は、それぞれ、11.9% (平均 1.11 ng/ml), 11.6% (2.25 ng/ml) および 7.4% (6.07 ng/ml) であった。また、同様に測定した時の、測定間 CV (N=6) は、それぞれ、22.4% (0.86 ng/ml), 25.2% (2.22 ng/ml) および 17.8% (6.39 ng/ml)

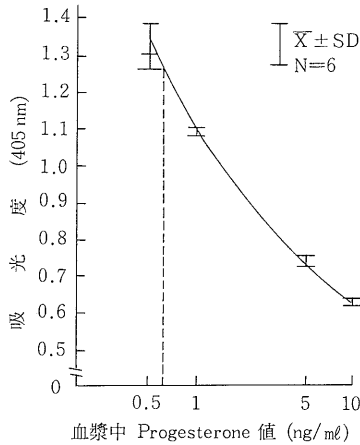


図1 Ovucheck 血漿中 Progesterone EIA キットの標準曲線の1例

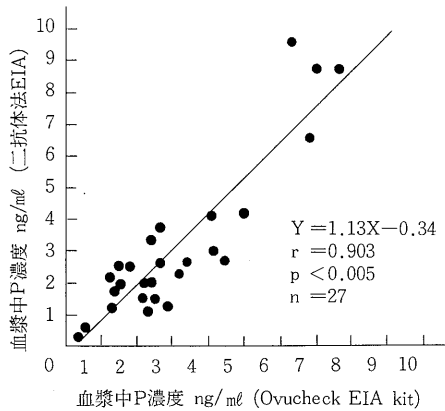


図2 Ovucheck EIA キットと二抗体法 EIA による血漿中 Progesterone 濃度測定値の相関

であった。

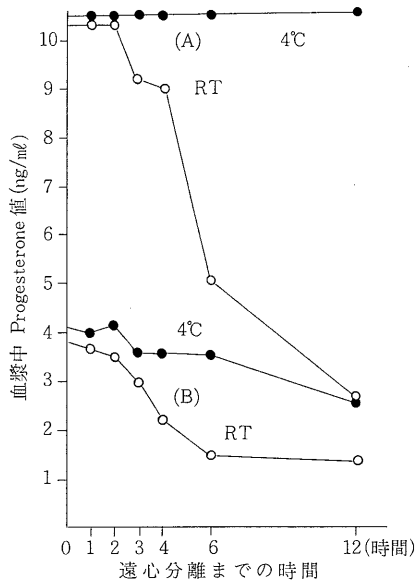
(3) 二抗体法 EIA による P 測定値との相関：同一サンプルの P 濃度を、本キットと二抗体法 EIA^{1D} によって測定した場合の両測定値間には高い相関 ($r=0.903$, $P<0.005$) が認められた (図2)。

2) 採血後の保存温度と時間経過に伴う血漿中 P 値の変動

ヘパリン加血液を 4℃ に保存した場合、採血後 2 時間までは血漿中 P 濃度にはほとんど影響は認められず、それ以降もあまり顕著な減少は認められなかった (図3)。いっぽう、ヘパリン加血液を室温 (25℃ 前後) に保存した場合、3 時間後には P 値の明らかな減少が認められ、その後も著しく減少した。

3) 本キットによる早期妊娠診断成績

AI 後 22~24 日目における血漿中 P 濃度を妊娠例と非妊娠例にわけて図4に示した。妊娠例はいずれも 1.0 ng



注) (A), (B) : サンプル RT : 室温 (25℃ 前後)
図3 血漿採取後の保存温度と時間経過に伴う血漿中 Progesterone 濃度の変動

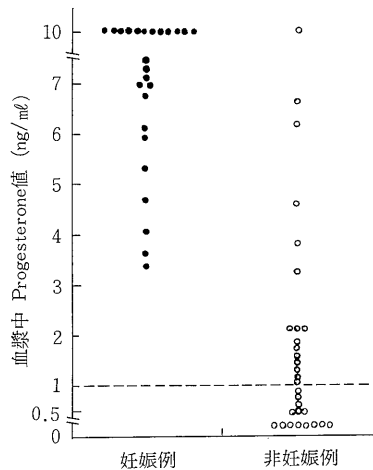


図4 妊娠例および非妊娠例における AI 後 22~24 日目の血漿中 Progesterone 濃度

/ml 以上で、約半数は 10.0 ng/ml 以上の高値を示した。いっぽう、非妊娠例では約半数が 1.0 ng/ml 未満の低値を示したが、1.0 ng/ml 以上を示すものも比較的多くみられた。

P 値が 1.0 ng/ml 以上のものを妊娠例、1.0 ng/ml 未満のものを非妊娠例と判定した場合の適中率は、非妊娠例では 14 例中 14 例 (100%)、妊娠例では 41 例中 25 例 (60.9%) であった。

4) 本キットによる無発情牛の卵巣疾患鑑別成績

直腸検査によって機能性黄体を有する無発情例と診断

された 20 例のうち、血漿中 P 値が 1.0 ng/ml 以上で機能性黄体を有することが確認されたのは 17 例 (85%) であった。いっぽう、卵巢静止例で、血漿中 P 値が 1.0 ng/ml 未満で、直腸検査所見と一致したのは 5 例中 3 例であった。

なお、P 値による鑑別結果と治療成績との関係をみると、直腸検査上機能性黄体を有すると判定されクロプロステノールを投与された 20 例のうち、P 値が 1.0 ng/ml 以上の 17 例では 6 日以内における発情誘起例は 10 例 (58.8%) であったが、P 値が 1.0 ng/ml 未満の 3 例では 1 例も発情が誘起されなかった。また、フェリチレリンを投与した卵巢静止例 5 例では、P 値が 1.0 ng/ml 未満の 3 例は全例 30 日以内に発情を示したが、1.0 ng/ml 以上の 2 例では 30 日以内の発情は認められなかった。

3. 考 察

ホルモン測定法を臨床に応用するに当たっては、測定値の信頼性が高く、操作が簡便で、短時間で済み、しかも経済的であることが重要となる。

本キットにおける測定感度は、最少標準 P 量 0.5 ng/ml に基づいて求めた測定最少限度濃度 0.6 ng/ml として表わした場合、これまでの他の EIA^{8,10,11,24)} における測定感度と比べてやや劣っているが、牛の機能性黄体の有無の判定基準が 1.0 ng/ml であることからすれば、臨床応用上ほとんど問題はないものと考えられる。

測定値の再現性については、測定内 CV はほぼ満足できるものと考えられるが、測定間 CV がやや大きく、その理由の詳細は不明である。ただし、測定値の再現性については、操作における熟練の程度も影響すると考えられ、平子ら⁵⁾ は本キットによる P 測定値の測定間 CV が 9~15% と良好であったことを報告している。したがって、初めてキットを使用する場合は、おおよその P 濃度を推定できる妊娠牛や発情牛の血漿を用いて再現性をチェックしておいてから、サンプルの測定を始めるのが適切である。

本キットによる血漿中 P 測定値は、血漿中 P を石油エーテルで抽出後に二抗体法 EIA で測定した値とよく一致しており、両測定値間には高い相関が認められた。なお、今回、本キットの P に対する特異性については検討しなかったが、キットの説明書によれば、牛の血漿中に存在すると考えられる他のステロイドとの交叉率は無視できるほど小さいとされている。したがって、本キットは 0.5 ng/ml 未満の測定値が得られないことと、P 濃度の低いところでの再現性が若干悪いということを除けば、信頼性の高い P 測定法といえる。

血液採取後の保存温度および時間経過による血漿中 P 濃度の変動については、これまでにも、百目鬼ら³⁾、WISEMAN ら²³⁾ および REIMER ら¹⁷⁾ の報告があり、血液を

室温で保存した場合、血漿中 P 濃度が時間経過に伴って急激に減少するが、4°C で保存するとその減少が緩慢になることが明らかにされている。今回の著者らの成績もこれらの報告とほぼ一致していた。したがって、血漿中 P 濃度を正確に測定するためには、採血後ただちに氷水などで 4°C に冷却し、速やかに遠心分離するか、遅くとも 2 時間以内に分離すべきであろう。

次に、本キットを用いた血漿中 P 濃度測定によって、早期妊娠診断を試みた。AI 後 22~24 日目においてそれまでに発情の回帰がみられなかった例について血漿中 P 濃度を測定し、1.0 ng/ml 以上を妊娠、それ未満を非妊娠とした¹⁸⁾。今回の妊娠診断の適中率は、妊娠例で 60.9% (25/41)、非妊娠例では 100% (14/14) であった。わが国でこれまでに報告されている脱脂乳、全乳および血漿中 P 測定による妊娠診断の適中率は、妊娠例で 80~90%^{8,14,19,21,22)}、非妊娠例では 97~100% であるが、妊娠例の適中率が 60% 程度であったという報告¹²⁾ もある。

AI 後 22~24 日目頃の血漿中 P 値が 1.0 ng/ml 以上でありながら、40 日目以降の直腸検査で非妊娠であった例については、その原因として、22~24 日目以降の胚の死滅や黄体期の延長のほか、AI 時の発情鑑定失宜 (黄体期 AI) などもあげられる¹²⁾。今回の試験に用いた例は未経産牛であり、牛群管理者の発情発見が必ずしも正確に行われていなかった牛群であったことからすると、胚の死滅とともに AI 時の発情鑑定失宜の例も含まれていたものと考えられる。いずれにしても、P 測定による早期妊娠診断の意義は非妊娠例の早期摘発にあることからすると、本キットは妊娠診断法として十分に応用価値があるものと考えられる。

臨床応用のもう一つの試みとして、無発情牛の卵巢疾患の鑑別を行った。直腸検査によって機能性黄体を有する例として診断された 20 例と卵巢静止と診断された 5 例のうち、血漿中 P 値による鑑別結果と一致したのは、それぞれ 85% (17/20) と 60% (3/5) であった。直腸検査による誤診例は、結果的に、黄体がないのに PGF_{2α} を投与されたり、逆に黄体があるのに GnRH を投与されたことになり、当然、十分な治療効果が得られなかった。無発情の判別を正しく行うには、直腸検査の技術を高め、腔検査を併用するなどの努力も必要であり、血漿中 P 測定はより確実な診断方法であるということだけでなく、臨床技術を向上させる上でも有用であり、さらに、治療が無効であった場合は、その原因を推定する上にも役立つ。

以上のように本キットは、血漿中 P 濃度自体を測定する目的で用いる場合は、最少標準 P 量である 0.5 ng/ml 未満の測定値が得られず、測定最少限度量 0.6 ng/ml 未満の値は信頼性がないという限界があるが、機能性黄体の有無および黄体機能の程度を推定する方法として実用

性が高いと考えられる。

稿を終えるにあたり、材料採取にご協力いただいた本学園元野幌農場職員各位ならびに、Ovucheck EIA キットを提供されたデンカ製薬株式会社に深謝する。

引用文献

- 1) BALL, P. J.: *Res. Vet. Sci.*, 25, 120~122 (1978).
- 2) DOBSON, H., RANKIN, J. E. F., and WARD, W. R.: *Vet. Rec.*, 101, 459~461 (1977).
- 3) 百目鬼郁男, 中原達夫, 尹 漢武, ほか: 第 82 回日本獣医学会, 盛岡 (1976).
- 4) HANSEL, W.: *J. Reprod. Fertil., Suppl.* 30, 231~293 (1981).
- 5) 平子 誠, 仮屋堯由, 百目鬼郁男, ほか: 第 102 回日本獣医学会, 仙台 (1986).
- 6) 伊丹 均, 藤沢宋駿, 奥村 一: 家畜繁殖学会第 70 回大会, 仙台 (1986).
- 7) KING, G. J., HURNIK, F. J. and ROBERTSON, H. A.: *J. Anim. Sci.*, 42, 688~692 (1976).
- 8) 岸本裕治, 加藤 寛, 三谷通博: 日獣会誌, 40, 161~164 (1987).
- 9) McCaughey, W. J. and COOPER, R. J.: *Vet. Rec.*, 29, 508~510 (1980).
- 10) MUNRO, C. and STABENFELDT, G.: *J. Endocr.*, 181, 41~49 (1984).
- 11) NAKAO, T.: *Acta endocr.*, 93, 223~227 (1980).
- 12) NAKAO, T., SUGIHASHI, A., ISHIBASHI, Y., et al.: *Theriogenology*, 18, 267~274 (1982).
- 13) NAKAO, T., TSURUBAYASHI, M., HORIUCHI, S., et al.: *Theriogenology*, 11, 385~397 (1979).
- 14) 及川 大, 中尾敏彦, 森好政晴, ほか: 家畜繁殖誌, 33, 64~72 (1987).
- 15) POPE, G. S. and HODGESON-JOHNS L. S.: *Vet. Rec.*, 15, 154 (1975).
- 16) POPE, G. S., NAJZLIK, I., BALL, P. J. H.: *Br. Vet. J.*, 132, 497~506 (1976).
- 17) REIMERS, T. J., McCANN, J. P. and GOWAN, R. G.: *J. Anim. Sci.*, 57, 683~690 (1983).
- 18) ROBERTSON, H. A. and SARDA, I. R.: *J. Endocr.*, 49, 407~419 (1971).
- 19) 佐藤 繁, 富田和夫, 高橋英士, ほか: 日獣会誌, 38, 506~509 (1985).
- 20) SEGUIN, B., MOMONT, H. and BAUMAN, L.: *Bovine Practitioner*, No. 20, 85~90 (1985).
- 21) 竹内公志, 中尾敏彦, 森好政晴, ほか: 日獣会誌, 40, 95~99 (1987).
- 22) 谷中 匡, 井田京子, 佐々木捷彦, ほか: 家畜繁殖誌, 32, 63~68 (1986).
- 23) WISEMAN, B. S., VINCENT, D. L., THOMFORD, P. J., et al.: *Anim. Reprod. Sci.*, 5, 157~165 (1982/1983).
- 24) 安原稔夫: 北獣会誌, 27, 99~102 (1983).

《海外文献要録》

ブロイラー種鶏における *Chlamydia psittaci*, 鶏痘ウイルス,
Haemophilus gallinarum の混合感染

Mixed Infection with *Chlamydia psittaci*, Fowlpox Virus and
Haemophilus gallinarum in Broiler breeder Chicks

M. MALKINSON, S. MACHANY, A., ARONOVICI, K., et al.: *Vet. Rec.*, 120, 461~462 (1987).

家鶏は鳥類の中で *C. psittaci* に対する感受性が最も低い仲間の一つである。本報告は、10 カ月齢の 1 ブロイラー種鶏群に発生した疾病について記述したものである。この鶏群は、生前は頭部および脚の皮膚の痂皮形成、眼瞼閉鎖にいたる眼瞼結膜炎を特徴として、月当たりの死亡率上昇 (1.5%)、産卵率低下 (58% 産卵率)、鶏回虫の慢性寄生を示した。痂皮からは鶏痘ウイルスが分離された。

しかし、眼炎が重症であったためクラミジア感染を疑い、フルオレセイン標識モノクローナル抗体を用いた直接蛍光抗体法を結膜のぬぐい液および脾の塗抹標本に施

した。その結果、それらにクラミジアに典型的な基本小体が証明された。同時に *H. gallinarum* も眼から分離された。クラミジア感染の血清学的証明として ELISA を行い、鶏血清および卵黄抽出物に抗体を証明した。本例は *C. psittaci* が主原因になって眼病変を惹起した混合感染例である。本病発生の誘因としては、鶏痘ワクチンを 3 カ月齢で再接種しなかったことがあげられる。*C. psittaci* の感染源としては養鶏場周囲にいた野性のハトが考えられる。また、その原因体の撒布としては、3 日間吹き荒れた強い風が考えられた。

(日本獣医師会雑誌編集委員会)