

Progesterone測定用EIAキット(プレグテスト)の実用性について

誌名	日本獣医畜産大学研究報告 = The bulletin of the Nippon Veterinary and Zootechnical College
ISSN	03738361
著者	吉村, 格 堀内, 俊孝 沼辺, 孝
巻/号	37号
掲載ページ	p. 16-21
発行年月	1988年12月

Progesterone 測定用 EIA キット (プレグテスト) の実用性について

吉村 格¹⁾・堀内俊孝²⁾・沼辺 孝²⁾・大久範幸²⁾
高田直和²⁾・石川勇志²⁾・本好茂一³⁾

¹⁾日本獣医畜産大学付属牧場

²⁾宮城県畜産試験場

³⁾日本獣医畜産大学獣医内科学教室

要 約 牛の Progesterone (P) 濃度を測定するため、日本で開発されたキット (P 測定 EIA キット・テイゾー；プレグテスト) の実用性について検討した。本キットによる血清中 P 濃度の測定値と同時に測定した RIA 測定値の間には、強い相関 ($r=0.943$, $P<0.01$, $n=42$) が認められた。また中尾らの EIA 二抗体法の測定値との間にも強い相関 ($r=0.914$, $P<0.01$, $n=42$) が認められた。

黄体の大きさと本キットによる血中 P 濃度の関係について検討したところ、黄体の大きさが、 0.5×1.0 cm のものでは P 濃度は 1.14 ± 0.50 ng/ml、 1.0×1.5 cm のものでは 1.96 ± 0.51 ng/ml であり、黄体の大きいものが P 濃度は高い傾向にあった。

また、発情後 7 日目における受精卵移植牛 (受卵牛) の本キットでの選定指標値を検討したところ、 1.8 ng/ml 以上 (受胎率 46%) を示したものに移植を行うべきと考えられた。

本キットは測定値の信頼性も高く、測定手法も簡便であり、性周期の把握、受卵牛選定等野外での臨床応用にも十分に活用できると考えられた。

キーワード：受精卵移植，プロジェステロン，EIA キット

日獣畜大研報，37，16～21，1988.

Progesterone (P) は主に、黄体から分泌されるステロイド・ホルモンで、受精卵の着床・妊娠の維持などに重要な役割を果たしている。分泌された P は、血液における半減期が極めて短く、末梢血中 P 濃度の測定は、黄体での分泌機能を表す有力な指標となっている^{3,11)}。

血中 P の定量法は、従来ラジオ・イムノ・アッセイ (RIA) によって行われてきたが、特殊な施設・設備・器具を必要とし、又ラジオ・アイソトープ (RI) 汚染の危険もあるため、これらの短所を補い得る方法が考えられてきた。

近年、急速に開発が進められてきたのが、標識物質として、RIA の代わりに酵素を用いるエンザイム・イムノ・アッセイ (EIA) である。国内でも測定用の簡便な EIA キットの開発が行われ、フィールドにおける応用性が注目されている。

一方、牛の受精卵移植においては、移植時の黄体機能の良否が、受胎性を左右する大きな要因と考えられ、黄

体機能の客観的判定が課題となっている。受卵牛の選定指標として黄体機能の推察はこれまで直腸検査法により実施され、多くの繁殖情報を把握してきたが、この検査法は官能検査であるため、技術の熟練度により、正確さ、客観性をに乏しい点が短所とされている⁷⁾。

本研究では、牛の Progesterone (P) 濃度を簡易に測定するため新しく開発された、P 測定 EIA キット・テイゾー；プレグテストと従来から行われている RIA 及び EIA 二抗体法との測定値を比較検討した。

また、本キットを用いて発情日 (Day 0) における発情の良否 (強弱) と発情後 7 日目 (Day 7) の P 濃度及び黄体期 (Day 7) における黄体の良否 (大きさ) と Day 7 の P 濃度の関係を比較した。

さらに P 濃度による受精卵移植牛としての選定指標値の検討も行った。

材料及び方法

1. 供試牛

日本獣医畜産大学付属小野田牧場繋養のホルスタイン種未経産牛 (14~17ヶ月令) のうち、正常性周期を少なくとも2回以上確認した17頭を用いた。

2. 供試血清

発情日 (Day 0) 及び黄体期 (Day 7) に供試牛の尾静脈より採血し、1時間以内に 3,000 rpm にて 20 分間遠心分離を行い、分析まで -20°C 以下で保存し供試した。

3. プロジェステロン (P) の測定

血清中の P 濃度の測定は、P 測定 EIA キット・テイゾー; プレグ・テスト, 神戸川・牧野らの RIA 及び中尾らの EIA 二抗体法で実施した。

P 測定 EIA キット・テイゾーは、抗プロジェステロン抗体で感作したビーズ (抗体感作ビーズ) と酵素標識プロジェステロン (酵素標識抗原) と検体中のプロジェステロンを競合結合させる酵素免疫測定法である。

1キットで同時に20検体測定可能であり、検体としては脱脂乳、血清、血漿を測定することが可能で、P の検出感度は 0.2 ng/ml 、測定可能範囲は $0.2\sim 18\text{ ng/ml}$ である。

このキットの測定操作を以下に示すと、被検血清を室温にて融解後 0.05 ml を先尖試験管にとり、石油エーテル (残留農薬分析用) 約 2 ml を加えて、ミキサーで1~2分間 P の攪拌抽出を行う。石油エーテル層を別に用意した試験管に移し、 $45\sim 50^{\circ}\text{C}$ の温水浴中で蒸発乾固し、乾固後窒素ガスを吹き込んで、試験管内の石油エーテルを完全に除去する。リン酸緩衝液 (pH 7.0) 0.1 ml を正確に加え、混和溶解し、希釈検体とする。

各試験管に調製した希釈検体及び各濃度 ($0.1, 0.3, 1.0, 3.0, 9.0\text{ ng/ml}$) の標準液 0.1 ml に、酵素標識抗原 ($\beta\text{-D-}$ ガラクトシダーゼ標識プロジェステロン) 0.1 ml を各々加えて混和し、更に抗体感作ビーズを各試験管に一定間隔で加え攪拌し、 4°C で60分間静置する。

その後、反応液をアスピレーターで吸引し、水冷した洗浄液 (0.15 M 塩化ナトリウム溶液) 2 ml を加え、洗浄を2回繰り返す。基質液 (O- ニトロフェニール・ $\beta\text{-D-}$ ガラクトピラノシド, 含メルカプトエタノール) 0.5 ml を一定間隔で試験管に分注し、 37°C の恒温中に30分間静置する。

反応停止液 (0.1 M 炭酸ナトリウム溶液) 2 ml を加え、よく混和し、1時間以内に波長 420 nm で反応液の

吸光度を測定し、標準曲線より検体の P 濃度を求める (Fig. 1)。操作時間は約3時間であった。

また中尾ら⁷⁾ の EIA 二抗体法の測定法を Fig. 2 に示した。操作時間は約24時間であった。

4. 牛の発情、卵巢および黄体の検査

Day 0, Day 7 に直腸検査法による卵巢の触診を行い、発情及び黄体の良否で、それぞれ以下のように分類した。

発情の良否は卵巢中に卵胞が存在し、陰部は赤膨するが、発情粘液をほとんど出さずスタンディング発情を示さないものを不可、卵胞が存在し、発情粘液を少量出すが、スタンディング発情を余り示さないものを可、又卵胞が存在し、発情粘液を流して、スタンディング発情を強く示したものを良とした。

黄体の良否は黄体の大きさを基準に、明瞭な黄体形成

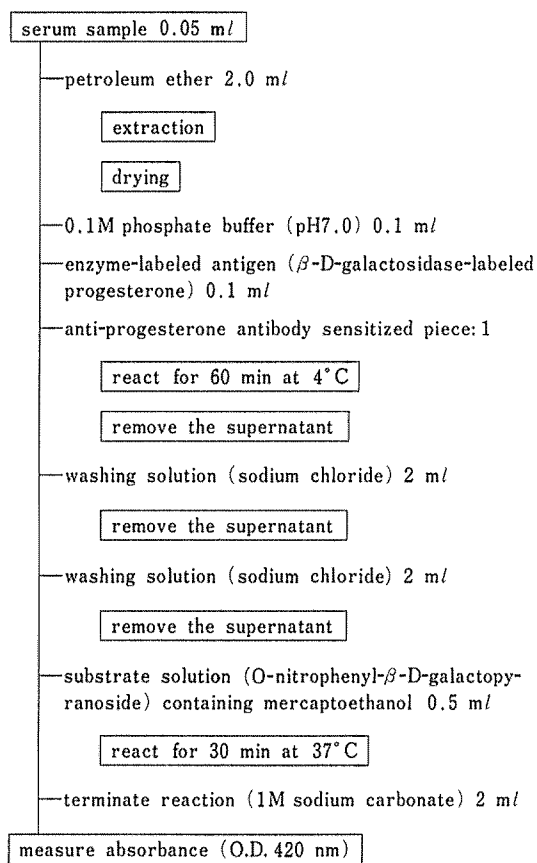


Fig. 1. Procedure for measuring progesterone concentration using the Teizo P EIA kit.

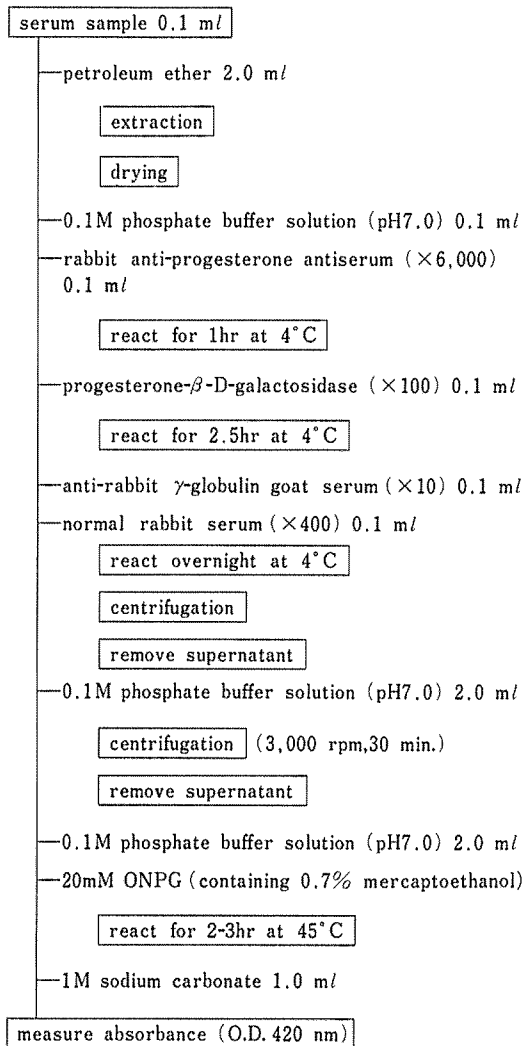


Fig. 2. Determination of progesterone concentration by NAKAO et al.'s double-antibody EIA method.

が認められないもの (0.5×1.0 cm 程度) を不可, 明瞭ではあるが充実感に欠けるもの (1.0×1.0 cm 程度) を可, 又明瞭でしかも充実した黄体 (1.0×1.5 cm) を良として, それぞれ 3 段階に分類した。

5. 胚の移植

宮城県畜産試験場繋用の黒毛和種に過剰排卵処置を行い, 発情後 7 日目に胚を採取した。採取した胚は, WRIGHT ら¹⁵⁾ の形態的分類で A ランクのを鈴木らの方法により凍結保存し, 受卵牛の Day 7 に融解し, 直接子宮頸管経由法により移植を実施した。

結 果

1. 測定値の相関

本キットと RIA による測定法において, 供試牛のべ 21 頭, 42 検体での両者の P 濃度の測定値間には, 強い相関 (r=0.943) が認められた (P<0.01)。回帰式は $Y = 0.83 X + 0.2$ であった (Fig. 3)・(Table 1)。

また本キットと EIA 二抗体法の間で, 強い相関 (r = 0.914) が認められた。

2. 発情の良否とプロジェステロン

供試牛の発情の良否と Day 7 における P 濃度の関係について Fig. 4 に示した。

発情を不可と分類した 5 頭の牛においては, Day 7 での血中 P 濃度は $1.14 \pm 0.5 \text{ ng/ml}$, 同じく可と分類した 4 頭では $1.75 \pm 0.32 \text{ ng/ml}$, 良と分類した 19 頭においては $1.96 \pm 0.51 \text{ ng/ml}$ であり, 発情の状態がよくなるに従って, Day 7 における濃度は上昇する傾向にあった。

3. 黄体の良否とプロジェステロン

供試牛の Day 7 における黄体の良否と P 濃度の関

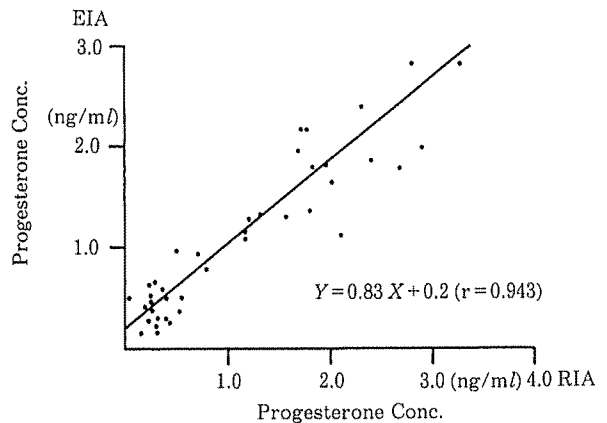


Fig. 3. Correlation between progesterone concentration in serum measured by enzyme immunoassay and radioimmunoassay.

Table 1. Progesterone Concentration in serum at Day 0 and Day 7 after ovulation by EIA and RIA

	N	Day 0	Day 7 (ng/ml)
EIA (Kit)	21	0.5±0.3	1.6±0.6
EIA (Nakao)	21	0.5±0.4	1.6±1.1
RIA	21	0.4±0.3	1.7±0.7

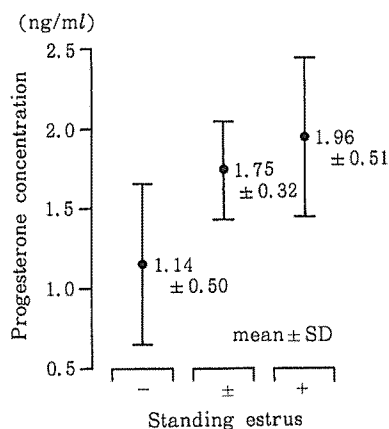


Fig. 4. Progesterone concentration on Day 7 relative to heat quality.

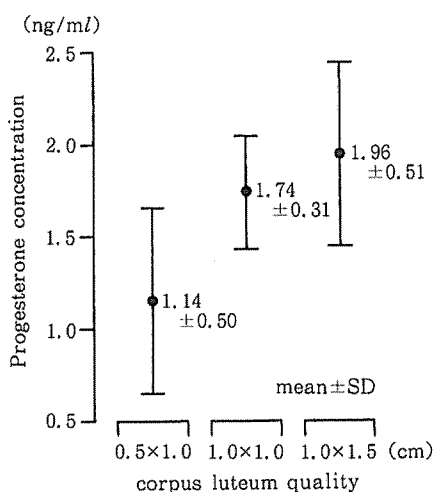


Fig. 5. Progesterone concentration on Day 7 relative to Corpus luteum quality.

係について Fig. 5 に示した。

黄体の触診で不可と分類した5頭の血中P濃度は $1.14 \pm 0.5 \text{ ng/ml}$ 、同じく可と分類した4頭では $1.74 \pm 0.31 \text{ ng/ml}$ 、良と分類した19頭においては、 $1.96 \pm 0.51 \text{ ng/ml}$ であり、黄体の形状が良くなるに従って、P濃度は上昇する傾向にあった。

4. プロジェステロン濃度と胚の移植

鈴木らのワンステップ法により、17頭に移植を行ったところ、Day 7でのP濃度が 1.8 mg/ml 以下ではまったく受胎せず、 1.8 ng/ml 以上を示した13頭のうち6頭が受胎(受胎率46%)した。

考 察

Progesterone (P) の定量は、これまでRIAが主流であったため、設備の整った実験室でしか分析することができなかったが、近年EIAが開発され、場所を選ばず、簡略な操作方法でPを測定することが可能となった。また最近ではEIAの改良が進み、測定試薬などがキットとして市販されるようになり、フィールドにおける幅広い応用が期待されている。P測定のEIAは、抗体と結合したPの回収方法の違いにより、二抗体法(DRAY *et al.*²⁾)と固相法(JOYCE *et al.*⁵⁾; KAMONPATANA *et al.*⁶⁾; ARNSTADT & CLEERE¹⁾; SAUER *et al.*¹²⁾; YASUDA *et al.*¹⁴⁾)の二つに大別されるが、二抗体法は精度が高い反面、操作が複雑なのに対し、固相法は操作を簡略にできるため、臨床領域に应用される可能性が高い。既に固相としてセルロース微粒子(ARNSTADT & CLEERE¹⁾)、ポリスチレンボール(ITAMI *et al.*⁴⁾)、マイクロプレート(SAUER *et al.*¹²⁾; STANLEY *et al.*¹³⁾)を使った方法がキット化されている。

今回使用したキットは、帝國臓器製薬株式会社によって、国内で始めて開発されたP測定用のEIAキットで、固相としてはポリスチレンビーズを使用している。

操作方法の主な特徴は、スタンダードが緩衝液で作られているため、適当な有機溶媒を用いて抽出操作を行えば、多種の試料に対して測定可能であること、一般の分光光度計で吸光度を測定できること、操作が簡単で測定に要する時間が約3時間と比較的短いことなどがあげられる。

本キットとRIA(神戸川・牧野ら)及びEIA二抗体法(中尾ら⁷⁾)との測定値では、本キットとRIA($r=0.943$)、本キットとEIA二抗体法($r=0.914$)の間で、それぞれ高い相関が認められた($P<0.01$)。このことから、今回用いたP測定EIAキット・テイゾー・プレグテストは、信頼性の高い血清中のP測定値が得られ、また操作方法も比較的簡単であることから、フィールドにおいても十分活用できるものと考えられた。

一方、牛胚の移植においては、移植時の黄体機能の良否が受胎性を左右する大きな要因と考えられている。RENSENら¹⁰⁾とNIEMANら⁸⁾は移植時の血中P濃度が $2\sim 5 \text{ ng/ml}$ の範囲にあれば最も高い受胎率が得られると報告し、またNORTHEYら⁹⁾は、血中P濃度が $2\sim 6 \text{ ng/ml}$ の範囲にあれば、最も高い受胎率が得られると報告している。

また、NIEMANらは移植時の黄体の形状と血中P濃度について、黄体の形状の良好なものほど、血中P濃

度は高値を示したと報告している。今回結果は、黄体の分類の方法や血中 P 濃度のレベルは異なったものの、NIEMAN らの報告を支持する結果となった。

また発情の良否とその後の黄体機能についての報告は少ないが、本実験において、発情徴候が明瞭であった牛は、Day 7 において血中の P 濃度が高い値を示したことから、発情の良否が受卵牛選定の一つの指標となることが考えられた。尚、発情徴候が明瞭で、しかも Day 7 における黄体形成の良好と思われた 13 頭の牛は、Day 7 での血中 P 濃度が 1.8 ng/ml 以上を示し、凍結融解胚を移植した結果 6 頭 (46%) の受胎が確認された。しかしながら、1.8 ng/ml 未満の血中 P 濃度を示した 4 頭の牛において受胎しなかった。受卵牛選定の一つの指標値として、Day 7 における血中 P 濃度が、1.8 ng/ml 以上であることが考えられ、これらの牛群に胚移植を実施することで、受胎率の向上につながるものと考えられた。

謝 辞

本実験の遂行にあたり、RIA の測定を快く引き受けられた東北大学家畜繁殖学教室、梅津元昭博士に深謝する。

文 献

- 1) ARNSTADT, K.I. and CLEERE, W.F., (1981). Enzyme-immunoassay for determination of progesterone in milk from cows. *J. Reprod. Fert.*, **62**, 137-180.
- 2) DRAY, F., ANDRIEU, J.M. and RENAUD, F., (1975). Enzyme immunoassay of progesterone at the picogram level using β -galactosidase as label. *Biochem Biophys Acta.*, **403**, 131-138.
- 3) HOFFMANN, B., GUNNZULER, O. and HAMBURGER, R., (1976). Milk progesterone as a parameter for fertility control in cattle. *Br. Vet. J.*, **132**, 469-476.
- 4) ITAMI, H., FUJISAWA, M. and OKUMURA, H., (1986). Enzyme immunoassay for progesterone. *Jpn. J. Anim. Reprod.*, **32** (Suppl. 50), 214-215 (in Japanese).
- 5) JOYCE, B.C., READ, G.F. and FAHMY, D.R., (1977). A specific enzymeimmunoassay for progesterone in human plasma. *Steroids.*, **29**, 761-770.
- 6) KAMONPATANA, M., VAN DE WEIL, DFM., KOOPS, W., LEENANURUKSA, D., NGRAM-SURIYAROJ, C., USANAKORNKUL, S., (1979). Oestrus control and early pregnancy diagnosis in the swamp buffalo: Comparison of enzymeimmunoassay and radioimmunoassay for plasma progesterone. *Theriogenology.*, **11**, 399-409.
- 7) 中尾敏彦 (1986). 乳牛における乳汁中黄体ホルモン測定 of 臨床的応用. *家畜診療*, **282**, 5-19.
- 8) NIEMANN, H., SACHER, F. and ELSAESSER, F., (1985). Pregnancy rates relative to recipient plasma progesterone levels on the day of nonsurgical transfer of frozen/thawed bovine embryos. *Theriogenology.*, **23**, 631-639.
- 9) NORTHEY, D.L., BARNES, F.L., EYESTON, W.H. and FIRST, N.L., (1985). Relationship of serum progesterone, luteinizing hormone and the incidence of pregnancy in bovine embryo transfer recipients. *Theriogenology.*, **23**, 214.
- 10) REMSEN, L.G., ROUSSEL, J.D. and KARIHALOO, A.K., (1982). Pregnancy rates relating to plasma progesterone levels in recipient heifers at day of transfer. *Theriogenology.*, **23**, 631-372.
- 11) 佐藤 繁・富田和夫・高橋英士・菅原道正 (1985). 牛の人工授精後における血清中プロゲステロン濃度の変動と受胎成績. *日獣会誌*, **38**, 506-509.
- 12) SAUER, M.J., FOUKLES, J.A. and COOKSON, A.D., (1981). Direct enzymeimmunoassay of progesterone in bovine milk. *Steroids.*, **38**, 45-53.
- 13) STANLEY, C.J., PARIS, F., WEBB, A.E., HEAP, R.B., ELLIS, S.T., HAMON, M., WORSFOLD, A. and BOOTH, J.M., (1986). Use of a new and rapid milk progesterone assay to monitor reproductive activity in the cow. *Vet. Rec.*, **118**, 664-667.
- 14) YASUDA, T., MOURI, Z., MURAKAMI, Y., HIROKO M., KARIYA, T., DOMEKI, I. and MORI, J., (1986). Direct determination of progesterone in bovine milk by solid phase enzymeimmunoassay. The 78th Annual Meeting Abstracts of Jpn. Soc. Zootech Sci.: 8 (in Japanese).
- 15) WRIGHT, J.M., (1981). Non-surgical embryo transfer in cattle embryo-recipient interactions. *Theriogenology.*, **15**, 43-56.

Practical Application of EIA kit (Pregtest)
for Progesterone Assay

Itaru YOSHIMURA¹⁾, Toshitaka HORIUCHI²⁾, Takashi NUMABE²⁾,
Noriyuki OHISA²⁾, Naokazu TAKADA²⁾, Yuzi ISHIKAWA
and Shigekatsu MOTOYOSHI³⁾

¹⁾Animal Husbandry Experiment Station Nippon Veterinary
and Zootechnical College

²⁾Miyagi Prefectural Animal Industry Experimental Station

³⁾Department of Veterinary Internal Medicine, Nippon
Veterinary and Zootechnical College

ABSTRACT

We investigated the practical application of a kit developed in Japan (Teizo P EIA Kit; Pregtest) for the purpose of measuring progesteron (P) in cows. There was a high correlation between P values obtained using this kit and the results of RIA ($r=0.943$, $P<0.01$, $n=42$). These values were also highly correlated with the result obtained using NAKAO *et al.*'s double-antibody EIA method ($r=0.914$, $P<0.01$, $n=42$). In order to improve assessment of corpus luteum function and the rectal test method, we investigated the relation between corpus luteum size and blood P levels using this kit and found that when corpus luteum size was 0.5-1.0 cm, P concentration was 1.14 ± 0.50 ng/ml, and when corpus luteum size was 1.0-1.5 cm, P levels were 1.96 ± 0.51 ng/ml. P levels tended to be higher when corpus luteum size was larger.

When we investigated the 7th day after estrus, it appeared that transplantation should be performed when levels were 1.8 ng/ml or above (conception rate: 46%).

This kit is not only highly reliable, but determinations are easy to perform, and it may be applied to advantage clinically in the field to define the sex cycle, for selection of embryo transfer recipient cows.

key word: Progesterone, Pregtest, Embryo transfer

Bull. Nippon Vet. Zootech. Coll., No. 37, 16-21, 1988.