

生乳中プロジェステロン測定キットを応用したウシの発情・黄体期の判定

田中 健・竹内隆泰・近藤守人

Estrous Cycle Judgment of Dairy Cattle Using Progesterone Concentration Kit of Raw Milk

Ken TANAKA, Takayasu TAKEUTI and Morito KONDO

要 約

乳牛の繁殖成績の改善には農家自身が客観的に判定できる発情周期の簡易診断技術が有効である。そこで、生乳中のプロジェステロン測定キットを応用し、後搾りの生乳を使った発情や黄体期の判定方法を検討した。検査には、キットのプレートを2連結ウェルに切断して検査器具とし、同封されているプロジェステロン標準液 1 ng/mL を対照とした。検査の判定は、発色液投入 5 分後の発色性と投入 30 分後の色調で行った。キットを応用した簡易検査により 1) 発色液投入 5 分後に発色し 30 分後対照と同じ色調を発情、2) 投入 5 分後に発色せず 30 分後に対照より薄い色調を発情前後、3) 5 分後に発色せず 30 分後に透明なものを黄体期と判定が可能であった。

I 緒 言

乳牛の繁殖成績を改善するには、現場で客観的に判断できる発情周期の簡易診断技術が有効である。現在、発情を発見するための器具として、歩数計を応用して発情時の歩数変動や首の動作回数を測定する器具やヒートデレクターなどが販売されているが、蹄病・関節炎による歩行障害、つなぎ飼い・フリーストールなどの飼養形態により単独の使用では発情の判定が困難な状況である。そこでキット（牛乳中 P 測定キット「KMK」）を応用し、毎日搾乳する生乳を使って酪農家自身ができる発情や黄体期の判定方法について検討を行った。

II 材料および方法

1 検査の対象となる頭数および生乳

検査対象牛は、分娩後の発情周期回帰した 24

頭について、数日間隔で後搾り生乳（生乳）を採取した。検査対象なる検体は、任意の 1 乳房より採取し 15ml 試験管に投入した。生乳は 5℃ の冷蔵庫に保管して 1 週間以内に測定を行った。

2 生乳中プロジェステロンの測定

測定にあたり、検査 30 分前にキットに同封されている各試薬および生乳を室温に置き、振り混ぜて行った。測定は同封されている 4 種類のプロジェステロン (P₄) 標準液および検体を、キットのマニュアルに従い反応させ、P₄ 標準液の吸光度から検量線を作成し検体の P₄ 値を求めた。

3 発情周期回帰牛における P₄ 値の測定

分娩後の発情周期回帰牛 24 頭について数日間隔で生乳を採取し、キットにて P₄ 値を測定した。また、キットに同封されている 4 つの濃度の P₄ 標準液と生乳をマニュアルにより発色液を投入するまで行い、時間の経過と発色性を比較した。

Ⅲ 結 果

1 発情周期回帰牛における P₄ 値の測定

キットで測定した発情周期回帰牛 2 頭の生乳中 P₄ 値の推移は、図 1、2 のとおりである。P₄ 値は周期的に変動推移し、妊娠の判定だけでなく発情・種付け・黄体期・繁殖障害の判定が可能であった。

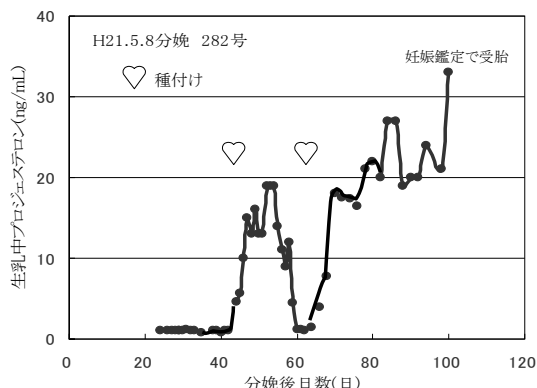


図1 分娩後の生乳中プロジェステロンの推移 (受胎牛)

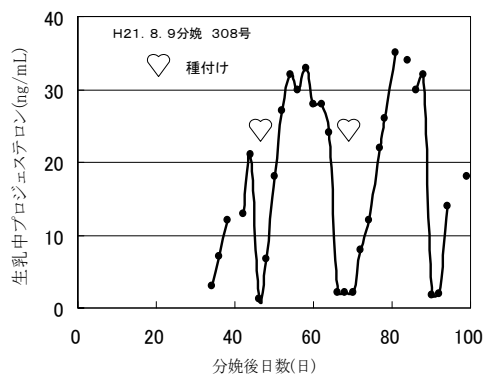


図2 分娩後の生乳中プロジェステロンの推移 (不受胎牛)

2 発情前後の生乳中 P₄ 値の推移

発情周期が回帰した 14 頭の発情前後 4 日間の生乳中 P₄ 値は、発情前 4 日目 16.8±9.3ng/mL、発情前 2 日目 6.9±9.9ng/mL、発情日 1.5±0.4ng/mL、発情後 2 日目 4.0±2.2ng/mL、発情後 4 日目 11.5±6.5ng/mL、と発情日が最も低かった (図 3)。また、キット測定時の発色液投入 30 分後の色調は、発情日が最も空色が濃く、その後次第に薄くなり、前後 4 日目には透明になった (図 3)。

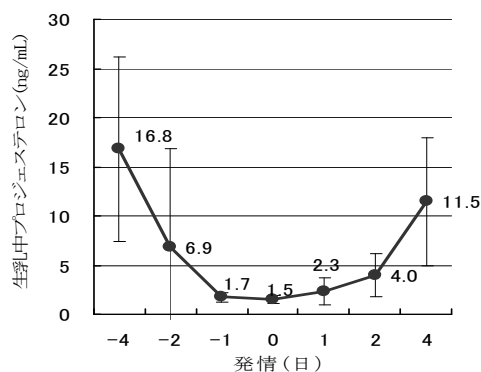


図3 発情前後の生乳中プロジェステロンの推移 (注) 平均値±標準偏差

3 P₄ 標準液と生乳の発色性の比較

発情日の生乳中 P₄ 値に最も近い P₄ 標準液 1 ng/mL と生乳の経過時間および発色性を比較した。発色液投入 5 分後に標準液と P₄ 値 2 ng/mL 以下の生乳が空色に発色した (写真 1)。投入 13 分後では 5 分で発色した 3 つのウェルの空色がより濃くなり、他は発色していなかった (写真 2)。投入後 25 分で P₄ 値 10~15ng/mL の生乳が発色した (写真 3)。

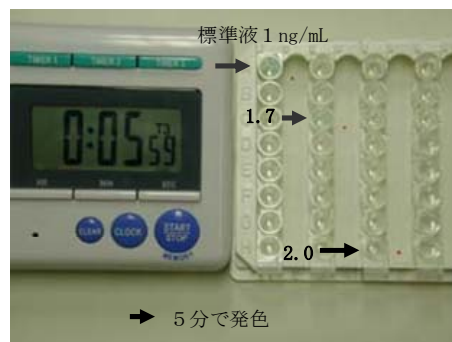


写真1 発色性の比較(発色液投入5分後)



写真2 発色性の比較(発色液投入13分後)

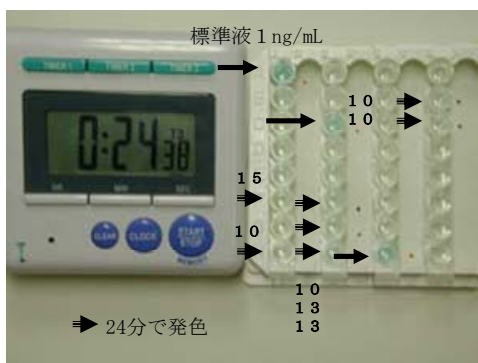


写真3 発色性の比較(発色液投入24分後)

4 キットを応用した簡易検査

1) 簡易検査器具の作成

キットのプレート(96ウェル 8連結ウェル×12)の連結部をハンダゴテで焼き、2連結のウェルに切断して検査器具を作成した。P₄標準液を入れるウェルにマジックで印を付けた(図4、)。

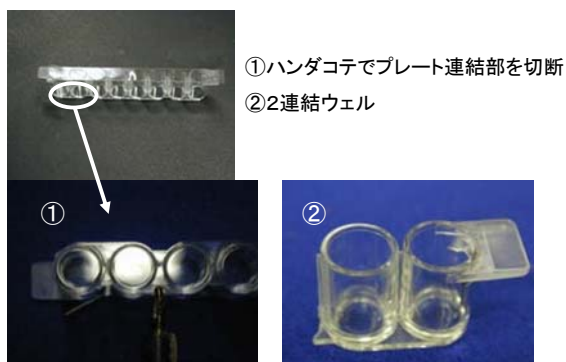


図4 検査器具の作製

表1 発情周期の簡易検査の検査方法

1. 検査用器具の作製
1) キット内プレート8連結ウェルを2連結に切断
2) 標準液を入れるウェルに印を付ける
2. 検査手順
1) 印のウェルに1 ng/mL標準液10 μL投入
2) 他方ウェルに検体の生乳10 μL投入
3) キットのマニュアルに従い発色液まで投入
3. 判定手順
1) 発色液投入 5分後に発色性を判定
2) 発色液投入30分後に色調を判定

2) 簡易検査の検査方法

2連結のウェルの印を付けた側のウェルにP

4標準液1 ng/mLを10 μL、他方に生乳を10 μL入れた。キットのマニュアルに従い、発色液200 μLを投入した(表1)。

3) 簡易検査の判定手順および判定基準

検査の判定は発色液投入5分後の発色性と30分後の色調で行った。

キットを応用した今回の簡易検査では発色までの時間および色調を肉眼で判定した。発色液5分投入後に発色し30分後に対照のP₄標準液1 ng/mLと同じく濃い色調を発情、投入後5分では発色せず30分後に対照より薄い色調を発情前後、5分後に発色せず30分後に透明なものを黄体期と判定できた(表2)。

表2 発情周期の判定基準

検査結果	発色性と色調	判定
検体 標準液	5分で発色 30分後に 標準液と同じく濃い	発情
	5分で発色しない 30分後に 標準液より薄い	発情前後
	5分で発色しない 30分後に透明	黄体期

4) 簡易検査の応用

簡易検査は必要に応じて2日間隔で2~3回実施し、結果の組み合わせから総合的に発情周期を判定することが可能であった(表3)。

表3 発情周期の簡易検査

検査結果(色調)			簡易判定	
初日	2日後	4日後	判定	対応
濃い	薄い		発情が終わり黄体形成	経過観察
濃い	透明		発情が終わり黄体形成	経過観察
濃い	濃い	濃い	排卵障害や卵胞のう腫	要治療
薄い	濃い		発情中	種付け
薄い	濃い	薄い	発情終了	発情終了
薄い	薄い	薄い	黄体形成不全の疑い	要治療
透明	透明	透明	黄体期	経過観察
透明	薄い	濃い	発情	種付け

IV 考 察

高泌乳牛は、泌乳の能力を最大限に引き出すため栄養不良や発病などが原因で繁殖機能回復が遅れ、その結果発情周期の回帰が不明瞭になりやすい。最近では生乳中の体細胞数のペナルティ制度により、酪農家の繁殖に関する観察不足や対応が遅れがちになっている。

今回、現場で客観的に判断できる発情周期の簡易診断技術を開発するため、酪農家が容易に材料を採取でき、搾乳作業時間（2時間）の間に判定ができる検査方法を検討した。牛乳中の P_4 値の測定は、黄体面積と相関があり¹⁾、黄体の P_4 分泌機能を知るための有効な方法であるものの²⁾、測定結果を判明するまでに時間を必要とする。今回用いたキットは妊娠判定用として販売され、広く研究者に発情周期診断の指標として利用されている。血中や生乳中の P_4 値の推移から、発情や繁殖機能診断が可能との報告がある^{3・4・5・6)}。そこで、キットを応用して簡易検査および判定方法を作成した。1回の検査で、発情周期の発情、発情前後、黄体期のいずれの時期にあるかを判定できるが、正確に発情前か後かの判定には2～3回の検査が必要である。今後は、現場普及を視野に入れ、微量の生乳、発色液などを正確に計量し投入する方法や検査器具の改良等を検討していく必要がある。

Theriogenology,61:637-649.2004

6) 中尾敏彦.乳牛の繁殖性低下の原因解明と繁殖性向上プログラムの開発.家畜人工授精,256:3～23.2010

参考文献

1) 金子一幸ら.超音波画像診断装置によるホルスタイン種乳牛における黄体機能の評価.日獣会誌,57:431-434.2004

2) 奥谷潔.ウシ黄体の機能に関する研究
Journal of Reproduction and Development,Vol 3:
No6.1997

3) 阿久沢正夫ら.生産獣医医療システム 乳牛編, 1 :90-92.2000

4) ranasinghe R.M.S.B.K,NakaoT,Yamada K,Koitke K.Silent based on walking activity and milk progesterone concentration in Holstein cows housed in a free-stall barn.
Theriogenology,44:643-646.2009

5) Shrestha H,NakaoT,Higaki T, and Akita M.Resumption of postpartum ovarian cyclicity in high-producing Holsten cow.

Estrous Cycle Judgment of Dairy Cattle Using Progesterone Concentration Kit of Raw Milk

Ken TANAKA ,Takayasu TAKEUTI and Kiyotaka SASAKI
Fukui Prefectural Livestock Experiment Station

The simple diagnosis technic of estrous cycle phase which a dairy farmer himself can judge objectively is effective for the improvement of the reproductive performance of the dairy cattle. So a progesterone concentration kit using raw milk was applied to judge estrous cycle phase. The plate of the kit is cut in 2 connection wells, respectively consist of inspection progesterone standard liquid (1ng/mL) and raw milk sample. The decision of the inspection went by coloring after the 5 minutes of addition 30 minutes color tone. The estrous cycle can be distinguished in three of the following standard by examining its time and color tone. 1) It can be judged estrous phase if a coloring begins in 5 minutes and the same color tone level of the contrast after 30 minutes. 2) It can be distinguished before or after the estrous by 30 minutes if it is thin in comparison with the contrast though it colors doesn't react even if a coloring liquid is thrown and it passes for 5 minutes.3) It can be judged a luteal phase if a color tone is transparent even if 30 minutes pass after a coloring liquid is thrown.