

総 説

診断マーカーに基づく牛の妊娠診断法とその活用

高橋 透

1. はじめに

牛の繁殖成績を構成する要素は多岐にわたるが、その中で最も重みづけの大きいものは①授精実施率であり、以下に②分娩後の初回人工授精日齢、③人工授精1回あたりの受胎率、という順で成績に影響する。更に、①の授精実施率は更にいくつかの要因に切り分ける事が可能であり、重要な順番に1) 発情発見率及び定時授精プログラム導入率、2) 不受胎確認後の再授精率、3) 繁殖障害治療率などが挙げられる。上記の①～③および1)～3) はいずれも重要な要素であり、それぞれについて膨大な研究実績があるが、本稿においては①-2) の不受胎確認後の再授精を的確に実施していくことを目的とした早期妊娠診断法について考察してみたい。

2. 妊娠診断の目的とは

家畜の繁殖管理における妊娠診断の目的は、妊娠を診断することではない。不受胎を摘発することが妊娠診断の目的である。繁殖学の教科書では「妊娠診断法」という項目があり、英語でも Pregnancy diagnosis という術語があることから、われわれは何となく妊娠を診断するのが妊娠診断であると思いがちであるが、「妊娠を診断する」とことと、「不受胎を摘発する」とことは同一ではない。早く妊娠が判ったところで分娩予定日が早まるわけではないが、不受胎を放っておくと次の分娩は確実に遅れてしまう。受胎率が100%であれば妊娠診断など不要であるが、現実の経産乳牛では授精したら半数以上が不受胎に終わる。不受胎摘発の意義はまさにここにある。

蛇足であるが、巷間ごく普通に使われる「妊娠鑑定」という用語は、獣医学のいかなる成書にも記載がない。動物の「診断」ができるのは獣医師のみであり、妊娠鑑定なる用語は法的に診断ができない事に

なっている獣医師以外の技術者を配慮した用語と推察される。生産者や他職種の技術者との日常会話としての「妊娠鑑定」は全く差し支えないが、獣医師同士の研究発表や論文の中では「妊娠診断」の用語を使うべきであろう。後述する新しい診断マーカーに基づく妊娠診断についても、検査キットから出てくる結果はあくまで「判定」であり、それを元に診断を下す事ができるのは獣医師のみであることを忘れてはならない。

3. 診断マーカーに基づく妊娠診断

直腸検査による胎膜触診法は牛の妊娠診断として古くから行われており、近年は直腸検査に超音波検査を組み合わせることで更に高精度かつ早期からの診断が可能である。直腸検査や超音波検査は、妊娠の確徴を検出して診断する最も直接的な妊娠診断法であるが、血液や乳汁に存在する特定の物質を指標として妊娠診断を実施することが試みられ、そのうちの幾つかは産業に実装されるに至っている。

(1) 血中及び乳汁に含まれるプロジェステロン (P_4) を指標とした妊娠診断法

診断マーカーに基づく牛の妊娠診断法として最も歴史があるものは、血中及び乳汁中の P_4 濃度測定法である [12]。 P_4 そのものは発情周期黄体と妊娠黄体の両者から分泌されるので、血中及び乳汁中の P_4 濃度の高値を以て妊娠と判定することはできないが、不受胎の場合には授精後3週間前後で発情が回帰するために血中及び乳汁中の P_4 濃度が低下する。この時期の P_4 濃度を測定して、高値であれば受胎、低値であれば不受胎と判定するのが本法の原理である。この方法は、採取が比較的容易な乳汁でも判定可能で、 P_4 測定が放射性同位元素を使わずに酵素免疫測定法 [9] を用いて一般の実験室で実施できたことから、1970

年代以降に大いに注目された。海外では、乳汁の検体に防腐剤を加えて検査機関に郵送すると、数日後に結果が返ってくるというシステムがあったと聞いている。

しかし、結果としてこの方法は広く普及するには至らなかった。この検査で妊娠陰性と判定された個体は全て不受胎であるが、妊娠陽性と判定されても授精後 40~50 日で直腸検査をしてみたら受胎していない個体が意外に多かったのである。その原因は大きく 2 つある。ひとつは牛の発情周期が平均 21 日とはいえ、正常範囲が 18 から 24 日とかなり幅があることである。発情後 21 日目の 1 点採材では、短い周期で発情が回帰して排卵してしまった後の黄体形成局面や、長めの発情周期で黄体がまだ退行しない場合があり、測定された P_4 濃度が高値を呈してしまう事例が生じてしまう。この問題には発情後 18~24 日にかけて 3 点程度の検体を採取する事で対処可能であるが、複数検体を用いても陽性判定の的中率は 85~90% 程度に留まる。何故 100% にならないのか？これは測定法が抱える欠陥ではなく、測定時は黄体が維持されていたにもかかわらず、その後に胚が死滅してしまっただけで不受胎になったと考えるのが妥当であろう。

授精後 3 週以降、5 週前後にかけての胚死滅は意外に多く、授精後 21 齢で生存していた胚の約 10% が次の 2 週間で死滅してしまうという報告もある [2]。現在ではインターフェロン応答遺伝子の発現定量による超早期妊娠診断が可能になり、授精後 21 日前後で確実に胚が生存しているというエビデンスを得ることが可能になったが、遺伝子発現定量による妊娠陽性判定の的中率が 90% を超えることは難しい [11]。これも遺伝子発現定量法の技術的問題ではなく、判定後に起きている胚死滅によってこのような結果になってしまう。

当時 (1970 年代) は、妊娠初期の胚死滅の発生を正確に把握することはできず、 P_4 測定の低い陽性的中率は、今から思えば「濡れ衣」であったのであるが、そのまま評価が確定してしまう事となった。

このまま不評が定着して忘れ去られるかに見えた P_4 測定ではあるが、実は近年復活を遂げている。ロボット搾乳システムに乳汁 P_4 測定モジュールが組み込まれ、発情検出や空胎摘発に活用されている [15]。 P_4 測定法は、妊娠診断法としては陽性的中率が低いために評価が低かったが、発情検知や空胎摘発には 100% の陰性的中率を実現することが可能であり、この目的で使う限りにおいては極めて有力なツールとなる。近年はマイクロプレートを使わないラテラルフ

ロー式の P_4 濃度の定性判定キットも海外で市販され、カウサイドで簡便に判定することが可能になっている [5]。

(2) 妊娠時に特異的に産生される物質を指標とした妊娠診断

1970 年代に大いに注目された P_4 測定ではあったが、その限界が見えてくると、やはり妊娠に特異的な物質をターゲットにして測定しなければ正確な判定ができない、と認識されるようになった。それでは妊娠した時のみに産生される物質は何か？現代であればトランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームなどの網羅的解析でターゲットを絞り込む事が可能であるが、1980 年頃はそのような手法は無論存在しなかった。そこで当時のパイオニア達が採用した手法は、牛胎盤をホモジナイズした抽出液をウサギに免疫して抗血清を作製し、この抗血清を非妊娠組織で吸収した後に残った抗体画分こそが妊娠特異物質に反応する抗体であろう、というかなり荒っぽい戦略であった。実験の結果、得られた抗体画分は 2 種類のタンパク質を認識することが判明し、それぞれが pregnancy-specific protein (PSP) A 及び B と命名された。後に PSP-A は α フェトプロテインだった事が判明し、PSP-B が胎盤組織で特異的に産生されるタンパク質であると結論づけられた [1]。作製された抗体を活用して胎盤組織から PSP-B タンパク質を精製し、放射免疫測定法による測定系を構築して妊娠全期間の母体末梢血中の PSP-B 濃度推移を検討した論文が発表されたのは 1986 年の事であった [8]。当時の論文を見ると、母体末梢血中の PSP-B は妊娠 24 日齢頃から検出され始め、妊娠の経過とともに濃度が上昇して分娩時に最高値となる、という現在でも通用する知見が報告されている。

その後、胎盤に特異的に発現するタンパク質の母体末梢血中の濃度プロファイリングの研究が行われ、PSP-60 [6]、pregnancy-associated glycoprotein (PAG) [13] などの血中動態が報告されたが、これらの血中動態は PSP-B のそれと極めて類似したものであり、それぞれのタンパク質の生化学的特性も極めて類似していた。

ここまで来れば、母体末梢血中の PSP や PAG 濃度を測定すれば妊娠 4 週前後で妊娠診断ができる事は誰でも思いつくが、この時点ではいくつかの課題が残されていた。胎盤で産生されて母体末梢血中に出現する PSP や PAG は、分娩後に胎盤が排出されると血中濃度が低下してゆくがその半減期は約 2 週間と長く、分

娩後数十日にわたって母体血中に残存する [8]。その場合、分娩後早期に交配した場合には前の妊娠時に産生された PAG がまだ血中に残存しており、本来不受胎であるものを受胎と誤判定してしまう恐れがある。測定系は高感度なほど妊娠早期からの判定が可能であるが、高感度な測定系ほど前回妊娠の影響が後々まで残ってしまうというジレンマがあった。

また、1980 年代から 90 年代にかけては超音波検査による牛の妊娠診断が普及し始めた時期であり、妊娠 4 週で妊否が判明する超音波検査は、検体を検査ラボに持ち帰らずとも牛舎でカウサイドの診断が可能であり、妊娠 4 週の検体採取とラボワークという二重の手間をかけて PSP や PAG を検査して妊娠診断を行うメリットは薄いと認識されていた感がある。

当初、PSP や PAG などと呼ばれたタンパク質の実体は不明な点が多かったが、1990 年代になって PAG は胎盤の栄養膜細胞で発現し、アスパラギン酸プロテアーゼファミリーに属するタンパク質であることが報告された。アスパラギン酸プロテアーゼとは活性中心にアスパラギン酸というアミノ酸を有する酵素の総称で、ペプシン、カテプシン、レンニンなどが含まれる。興味深いことに、PAG はアスパラギン酸プロテアーゼファミリーのメンバーでありながら酵素活性を持たず、その構造のみが酵素に類似している事が判明した [10]。また、PAG は、構造が類似したパラログ分子が多数存在して、牛ではその種類が 20 数種にも及ぶこと、それぞれの PAG 分子種が時間的（妊娠初期から後期にかけての経時変化）及び空間的（PAG が発現する胎盤栄養膜細胞の種類）に異なる発現様式を示すことが次々と明らかにされた [3]。1990 年代中頃の筆者は、PAG の cDNA クローニングを行っていたが、形質転換大腸菌から抽出されたプラスミドに組み込まれた塩基配列がコロニー毎に微妙に異なる事に当惑した記憶がある。当時は 20 数種類も遺伝子があるとは思いつかず、PCR のエラーやシークエンスの誤判読などを疑い、あれこれと原因を追求した事が思い出される。

PAG ファミリーに属する個々のタンパク質の発現プロファイルが解明されてくるにつれて、妊娠診断を目的とした PAG 測定のターゲットは、①妊娠初期に高発現で妊娠後期に発現せず、②母体内の血中半減期が短い PAG が望ましいと認識されるようになり、この目的に沿った ELISA 測定系が開発された [4]。現在では、日本国内でも簡便な検査キットが市販されている。

(3) PAG 検査を行う上での注意点と対策

1) 検査に使う検体の種類が検査に及ぼす影響

同じ検査キットを用いて同一個体の血清と乳汁の検体を測定すると、血清の方が濃度が高く（吸光度が高く）測定される。よって、測定だけの観点から見れば、血清を用いた方が乳汁よりも精度の高い検査が可能になる。数年前までは、PAG 検査の検査開始日齢は血清で授精後 4 週、乳汁で 5 週とされていたが、現在ではどちらも授精後 4 週から検査可能となっている。どちらの検体を用いても検査は可能であるものの、牛の品種や飼養形態に適した検体を選択する事が重要である。PAG 検査は簡便で低コストな妊娠判定法であるが、検体採取の為に採血操作が必要になれば、そのコストが検査費用を押し上げてしまう事に注意が必要である。

2) 検査の実施時期

血中や乳汁中の PAG は授精後 24 日頃から検出され始めるが、32 日前後で一旦ピークを形成した後に下降してゆき、60 日齢頃には 24 日齢程度のレベルにまで低下した後に再び上昇してゆく [7]。授精後 30 日頃から 60 日頃にかけては胚 / 胎子が旺盛に発育して胎盤形成が進行するにもかかわらず、母体の血清及び乳汁中の PAG 濃度が低下する原因は未だ解明されていない。想定される原因一つとして、市販の PAG 検査キットは、シグナル抗体にビオチン標識したモノクローナル抗体を用いている。このモノクローナル抗体は妊娠早期に特異的に発現する PAG 分子種（ターゲットの PAG 分子種はメーカーからは非公表）の特定のエピトープを認識していると想定され、この濃度推移は特定の PAG 分子の発現動態を反映している可能性がある。この検査法を利用する側としては、このような特性を理解しつつ検査を行う日齢を決定する必要がある。一例として、授精後初回の検査を 30～35 日齢前後、2 回目の検査を授精後 70～85 日前後に実施するプログラムであれば、「測定値の谷」の影響を受ける事なく判定が可能である。

3) 検査データの解釈

日本国内で実施されている PAG 検査による妊娠判定検査は、検査の吸光度の値によって、(+), (±), (-) の 3 段階の評価となっている。厄介なことに、初回の検査で (+) 判定であったにもかかわらず、2 回目の検査で (-) 判定になってしまう個体が少なからずある。特に 50 日齢以前の検査で吸光度が低い場合 (0.7 未満) で (+) 判定の場合には、その後に 40% 以上が (-) に転じるという成績もあり [14]。成績を評価するにあたっては、単に 3 つのカテゴリー

に区分するだけでなくその内容まで吟味する必要がある。

4) PAG 検査の得失について

近年拡大しつつある PAG 検査についてその得失を語る場合には、農場目線と獣医師目線ではその評価が異なってくる場合がある事に留意が必要である。乳汁を検体とした PAG 検査は、獣医師がこれに関わる事なく酪農組合や乳販連などが検査を実施してデータを農場に還元し、低コストで高精度な妊娠判定法として好評を博しているが、これは言葉を返せば獣医療を提供する側である獣医師の業務機会の逸失とも言える。それでは、専門職としての獣医師はこの現状にどのように対応していけば良いのであろうか。結論から言えば、PAG 検査の普及を敵視する事なく、これと上手に付き合うことによって、クライアントを定期的な繁殖検診に誘引するきっかけとして PAG 検査を活用することである。PAG 検査は (+), (±), (-) の判定が出るのみで、他の情報は無い。農場では PAG 検査に精通するにつれていろいろな課題に直面するであろう。ここに人間が介在する繁殖検診が入り込める余地が生じてくる。具体例の一つとして、授精後 30 日頃の初回の妊娠判定を PAG 検査で行い、フレッシュチェックと授精後 60~80 日齢で行う 2 回目の妊娠診断を獣医師が担当し、乾乳前のドライチェックを PAG 検査で行うというプログラムがある。半数以上が不受胎に終わる授精後 30 日頃の乳牛の妊娠診断を PAG 検査で実施してコストダウンを図り、子宮や卵巣の治療処置が必要になるかもしれない時期の検査を獣医師が担当するというプログラムである。

足下を見れば岩手県内における産業動物の獣医療提供体制は年々脆弱化しつつあり、現場の獣医師の奮闘だけではとても賄えない現実がある。今は「あらゆる」ヒト、モノ、技術を総動員していかなければ課題に対応できず、PAG 検査にも便利で有能な助っ人として活躍してもらう事になる。しかし、このような状況にあっても、「検査はキットでできるが診断を下すのは獣医師である」という鉄則を忘れてはならず、これを疎かにすると獣医師の職分はあっという間に人工知能に置き換えられてしまうかもしれない。

4. 繁殖管理の考え方

(1) 「車懸り」の繁殖管理

車懸りとは聞き慣れない言葉であるが、国語辞典によれば「車が回るように、一番手・二番手・三番手と休みなく兵を繰り出して敵に攻めかかる戦法」とあり、戦国の名将上杉謙信が好んだ戦法とされる。繁殖

管理における車懸りの一番手はフレッシュチェック、二番手は VWP が開けたら直ちに授精できるように準備する同期化プログラム、三番手は授精後の発情回帰の検出と再授精、四番手が早期妊娠診断と再授精、になる。要点は、国語辞典にあるように「休みなく兵を繰り出して敵に攻めかかる」ことであり、「何かやったからそれで事足れり」ではない。特に、「診断原理の異なる手法を複数組み合わせる」ことが重要であり、実際には PAG 検査に超音波検査を組み合わせた体制とすることで相互の欠点を補い合い、コストを抑えつつ診断の精度を高めることが可能になる。

巷間よく言われる受胎率低下は、実は牛群の繁殖成績にはそう大きな悪影響を及ぼさない。むしろ「再授精間隔の延長」、「分娩後初回授精日齢の遅延」の方が確実に分娩間隔を延長させる「真の悪玉」である。換言すれば、不受胎の場合の再授精間隔を短縮し、分娩後の初回授精日齢をバラつかせないように早めるだけで、分娩間隔は確実に短縮できる。受胎率を一足飛びに向上させるのは難しいが、最近は種雄牛の改良や凍結精液の製造技術の進歩などによって、国内の乳牛の受胎率は既に底を打った感がある。これからは「受胎率が・・・」と愚痴を言っていられる時代ではない。米国から遅れること約 10 年にして、日本でも潮目は変わったのである。

引用文献

- [1] Butler, J., Hamilton, W., Sasser, R., Ruder, C., Hass, G. and Williams, R.: Detection and partial characterization of two bovine pregnancy-specific proteins. *Biol Reprod.* 26, 925-933 (1982)
- [2] Ealy, A. and Seekford, Z.: Symposium review: Predicting pregnancy loss in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 102, 11798-11804 (2019)
- [3] Green, J., Xie, S., Quan, X., Bao, B., Gan, X., Mathialagan, N., Beckers, J. and Roberts, R.: Pregnancy-associated bovine and ovine glycoproteins exhibit spatially and temporally distinct expression patterns during pregnancy. *Biol Reprod.* 2000. 62, 1624-1631 (2000)
- [4] Green, J., Parks, T., Avalle, M., Telugu, B., McLain, A., Peterson, A., McMillan, W., Mathialagan, W., Hook, R., Xie, S. and Roberts, R.: The establishment of an ELISA for the detection of pregnancy-associated glycoproteins (PAGs) in the serum of pregnant cows and heifers. *Theriogenology.* 63, 1481-1503 (2005)

- [5] Ingenhoff, L., Hall, E. and House, J. : Evaluation of a cow-side milk progesterone assay and assessment of the positive predictive value of oestrus diagnosis by dairy farmers in New South Wales. *Aust Vet J.* 94, 445-451 (2016)
- [6] Patel, OV., Camous, S., Takenouchi, N., Takahashi, T., Hirako, M., Sasaki, N. and Domeki, I. : Effect of stage of gestation and foetal number on plasma concentrations of a pregnancy serum protein (PSP-60) in cattle. *Res Vet Sci.* 65, 195-199 (1998)
- [7] Ricci, A., Carvalho, P., Amundson, M., Fourdraine, R., Vincenti, L. and Fricke, P. : Factors associated with pregnancy-associated glycoprotein (PAG) levels in plasma and milk of Holstein cows during early pregnancy and their effect on the accuracy of pregnancy diagnosis. *J Dairy Sci.* 98, 2502-2514 (2015)
- [8] Sasser, R., Ruder, C., Ivani, K., Butler, J., Hamilton, W. : Detection of pregnancy by radioimmunoassay of a novel pregnancy-specific protein in serum of cows and a profile of serum concentrations during gestation. *Biol Reprod.* 35, 936-942 (1986)
- [9] Wimpy, T., Chang, C., Estergreen, V. and Hillers, J. : Milk Progesterone Enzyme Immunoassay: Modifications and a Field Trial for Pregnancy Detection in Dairy Cow. *J. Dairy Sci.* 69, 4P1115-1121 (1986)
- [10] Xie, S., Low, B., Nagel, R., Kramer, K., Anthony, R., Zoli, A., Beckers, J. and Roberts, R. : Identification of the major pregnancy-specific antigens of cattle and sheep as inactive members of the aspartic proteinase family. *Proc Natl Acad Sci USA.* 88, 10247-10251 (1991)
- [11] Yoshino, H., Toji, N., Sasaki, K., Koshi, K., Yamagishi, N., Takahashi, T., Toshina I-O., Matsuda, H., Yamanouchi, T., Hashiyada, Y., Imai, K., Izaike, Y., Kizaki, K. and Hashizume, K. : A predictive threshold value for the diagnosis of early pregnancy in cows using interferon-stimulated genes in granulocytes. *Theriogenology.* 107, 188-193 (2018)
- [12] Zaied A., Bierschwal, C., Elmore, R., Youngquist, R., Sharp, A. and Garverick, H. : Concentrations of progesterone in milk as a monitor of early pregnancy diagnosis in dairy cows. *Theriogenology.* 12, 3-11 (1979)
- [13] Zoli, A., Beckers, J., Wouters-Ballman, P., Closset, J., Falmagne, P. and Ectors, F. : Purification and characterization of a bovine pregnancy-associated glycoprotein. *Biol Reprod.* 45, 1-10 (1991)
- [14] 岩手県乳質改善協議会 酪農カレンダー2022 年版
- [15] 家畜改良センター新冠牧場 搾乳ロボットを活用した飼養管理技術及び 搾乳ロボットに適した後継牛生産について [https://www.nlbc.go.jp > api > assets > native](https://www.nlbc.go.jp/api/assets/native)