

ウシ黄体形成ホルモン検出キットの開発 ーウシ繁殖成績向上に向けた取り組みー

住友化学株式会社

バイオサイエンス研究所

谷 川 潤
関 典 昭
市 原 準 二^{*1}
川 村 哲 也
興 梶 順 也
宝 来 真 志
住 田 佳 代



はじめに

国内のウシ繁殖は、ほぼ100%が人工授精により実施されている。2021年の農林水産省畜産統計調査によると、国内の繁殖用ウシは約150万頭であり、年間の人工授精実施回数は約300万回と推定される。その受胎率は高生産性品種の育種、穀物飼料の多給などの要因による発情の微弱化、発情持続時間の短縮などにより低下傾向が続き、1989年には乳用ウシで62%、肉用ウシで66%だったものが、2017年には乳用ウシで42%、肉用ウシで50%となっている¹⁾。ウシの発情周期は平均21日で、発情期間は平均14時間である。発情開始後18~30時間の限られた時期に人工授精を行う必要があるため、ウシの発情を高精度に検出することが受胎率向上に重要である²⁾。人工授精に1回失敗すると、ウシを次の授精の機会まで余分に21日間飼育することになり、人工授精の費用や飼料代を含めて1頭あたり約10万円の損失が発生するため、ウシの効率的な繁殖管理は畜産経営において極めて重要である。

現在、ウシの発情は、飼育者による発情行動や健康状態の目視観察、あるいは動作を感知するモーションセンサーの情報などにより検出されているが、その判断は飼育者の熟練度に依存すること、また、判断の指標は発情に伴う間接的な事象であることなど

から発情の見逃しが問題になっている²⁾。また、目視観察には飼育者の多大な労力を要すること、センサーおよび周辺機器の導入に費用がかかることも課題である。また、発情検出に頼らない人工授精実施方法として、ホルモン製剤投与による排卵同期化処置・定時人工授精法が開発されている。この方法は人工授精実施予定日の1カ月~数週間前から定期的にホルモン製剤を投与して排卵時期を同期化するもので、理論上はすべての個体が同日、同時刻に人工授精適期を迎えることが期待される。しかし、実際には卵胞の成長速度の個体間の違いなどにより排卵時期にばらつきが生じ、発情検出による人工授精実施を上回る受胎率は達成されていない³⁾ (Fig. 1(A))。このような状況下、ウシの発情を迅速に検出するための、高精度かつ簡便な方法の開発が切望されている。

ウシ黄体形成ホルモン検出キットの開発

正常に性成熟したウシの卵巣では、卵胞が発育・成熟し、排卵するサイクルが平均21日で繰り返される。成熟した卵胞から分泌されたエストロゲン^{*2}は脳に作用し、発情が開始される。これと同時に黄体形成ホルモン (Luteinizing Hormone : LH、排卵誘発などを促進)^{*3}の一過性大量放出 (LHサージ) が起こり、大量放出されたLHは成熟した卵胞に作用し

*1 現所属：一般財団法人 バイオインダストリー協会

*2 エストロゲン：主に性周期にかかわるホルモンで卵巣から分泌される。血中エストロゲン濃度の急激な上昇は、卵巣内に排卵可能な成熟卵胞が存在するという情報を中枢に伝える。

*3 黄体形成ホルモン：脳の下垂体から分泌されるホルモンで、卵巣に作用して排卵を誘発する。

てエストロゲン産生を中止させるとともに排卵を促進する。血中LH濃度は発情および排卵の直接的な指標とすることが可能であり、ウシでは発情開始の6時間後に血中LH濃度がピークとなり、その12-24時間後が人工授精可能期間である (Fig. 1(B))²⁾。

ヒトにおいては、抗体を用いたLH検査薬が実用化され、排卵日予測に使用されている。しかし、ウシなどの家畜用の市販LH検査薬は存在せず、繁殖現場においてLH検査による発情検出は行われていない。そこで、ウシLHを高精度かつ簡便に検出するイムノクロマトアッセイキットを開発し、繁殖成績の向上につなげたいと考えた。

新規ウシLH抗体の取得およびイムノクロマトアッセイ系の構築

イムノクロマト法は、検査デバイスに検体を滴下して目的物質の有無を検出する抗原・抗体検査法で、その構築には目的物質の異なる部位を認識する2種類の特異的抗体、すなわち検出抗体と補足抗体が必要である。目的物質を含むサンプルをデバイスに添加すると、標識を施した検出抗体が目的物質に結合する。標識された検出抗体と目的物質の複合体はデバイス上を毛细管現象により移動し、線状に配置された補足抗体に結合するためテストラインが出現する。さらに、検出抗体を認識する別の抗体を線状に配置したコントロールラインの出現により、サンプルがデバイス上を正常に移動したことを確認できる (Fig. 2(A))。ウシLHに対する特異的抗体を取得するには、マウス・ラット・ウサギなどの宿主動物にウシLHタンパク質を投与し、ウシLH特異的抗体を産生する

免疫細胞をスクリーニングにより選抜する必要がある。本来、抗体は体内に侵入した異物を認識して排除するために作られ、自己を構成する物質に対する抗体はほとんど産生されない (免疫寛容)。ウシと免疫宿主動物のLHタンパク質の相同性が非常に高く、ウシLHは免疫宿主動物体内で「自己の物質」として認識されるため、ウシLHに対する特異的抗体取得の報告はほとんどない。

そこで、われわれは自己免疫疾患を有するマウスおよびラットを免疫宿主動物として用いる新規抗体取得法⁴⁾を開発し、この問題を解決した。自己免疫疾患を有する動物は免疫寛容が機能せず自己の物質に対する抗体を産生するが、これに起因する疾患のため生存期間が短く、抗体取得に長期間を要する通常の方法は適用できない。そこで、短期間で抗体取得が可能な腸骨リンパ節法⁵⁻⁷⁾を自己免疫疾患動物に適用することを着想し、ウシLH抗体の取得を試みた (Fig. 2(B))。その結果、これまで取得が困難だったウシLH特異的モノクローナル抗体を複数取得することに成功した^{8), 9)}。さらに、取得したウシLHモノクローナル抗体の組み合わせを検討し、ウシLHを簡便に検出可能なイムノクロマトアッセイ系を構築した。精製した天然ウシLHを添加したウシ血液をこの系に供したところ、抗原抗体反応を示すラインが検出された (Fig. 2(C))。

構築した検出系を用いて、LHサージを誘発するホルモンを投与したウシの種々の体液 (血液・尿・乳汁・唾液) 中のLH検出を試みたところ、血液中でのみ明瞭なLHサージが検出されることが判明した。

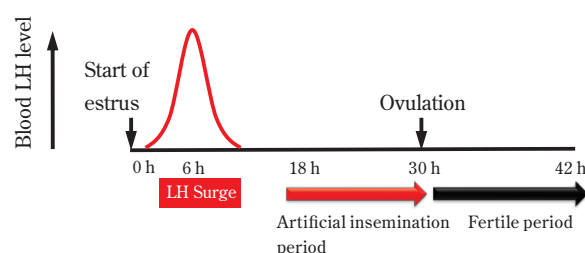
(A)

Method	Visual detection	Sensor	Synchronization
Procedure	Observation	Motion sensing	Hormone administration
Accuracy	△	△	△
Labor	△	◎	○
Cost	◎	△	△
Problem	Low detection rate	Low detection rate	Variation in estrus cycle

Fig. 1 Bovine estrus and artificial insemination

(A) Current estrus detection methods (B) Time course of bovine estrus and LH surge

(B)



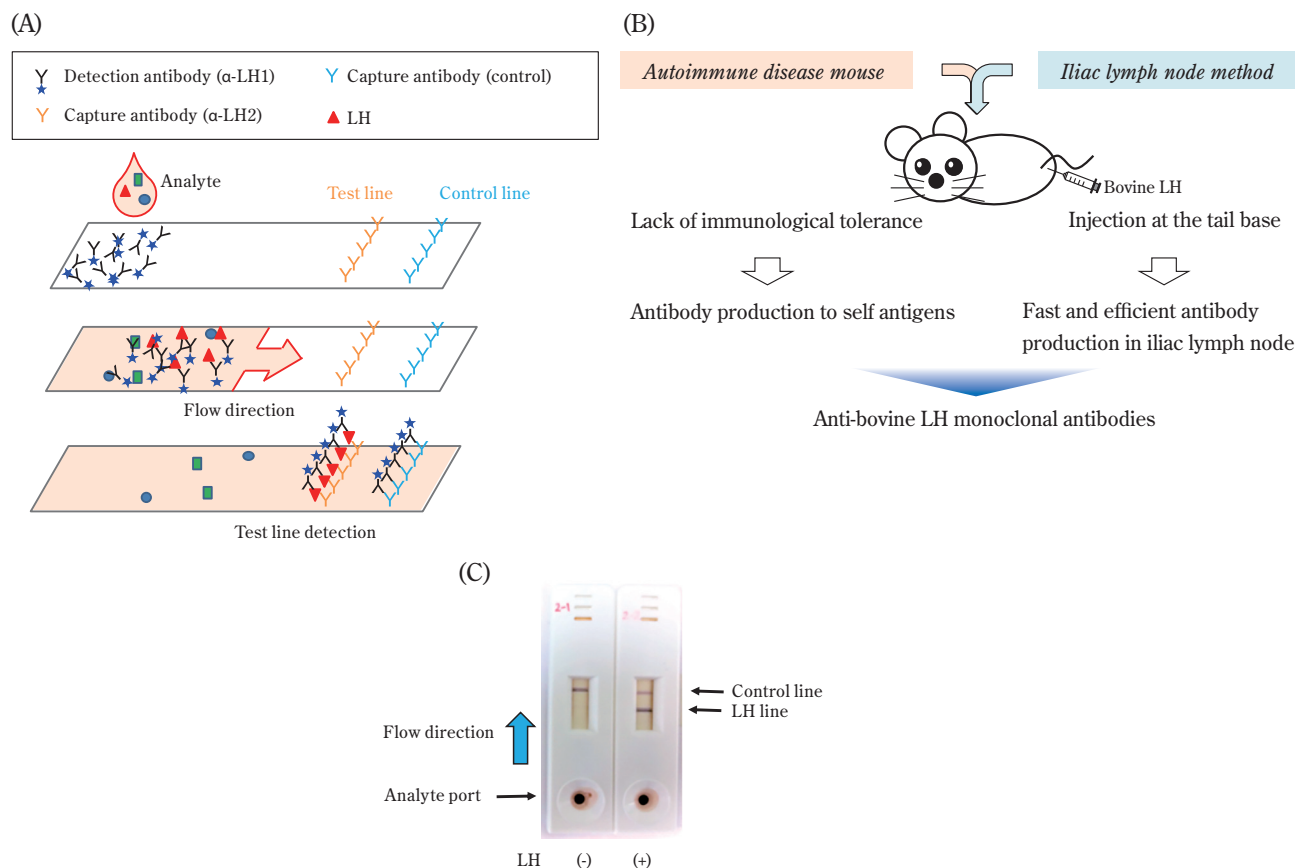


Fig. 2 Development of bovine LH immunochromatographic assay
 (A) An overview of immunochromatographic assay (B) A novel method for LH monoclonal antibody production (C) Detection of bovine LH in blood using immunochromatographic assay device

ウシLH検出キットの作製

上記の結果から、ウシ血液を対象とする獣医師向けの検査キットとして製品化することを目指し、採血針・内部に血液凝固阻害剤（ヘパリン）を塗布した採血管・イムノクロマトデバイスを一体化したLH検出キットを作製した（Fig. 3(A)）。本キットを用いることで、獣医師が片手でウシの尾静脈から1-2滴を採血して数分後に血中LHを検出可能になった。さらに、検出されるLHラインとコントロールラインの強度比較により、血中LH濃度の見積もりが可能なことも確認できた（Fig. 3(B)）。

獣医師へのアンケート調査

獣医師向け情報サイト（登録産業動物獣医師数：約600名）を通じて、開発したウシLH検出キットの価格設定や使用目的などに関するアンケート調査を

実施し、獣医師102名から回答が得られた時点で終了とした。その結果、ウシ血中LH検査薬について「ぜひ使用したい」または「使用したい」と回答したのは102名中89名（87%）であった。使用目的としては、「発情確認・発情時期の特定：64名（72%）」、「繁殖障害ウシの診断：46名（52%）」、「受精卵採取の品質向上：40名（45%）」であった。これら三つの用途で試作品提供希望者は多く、いずれも80%以上であった（Fig. 4(A)）。このうち、試験結果の取り扱いや採血時の事故に対する免責などについて同意が得られた28名の獣医師に試作品を提供した。その結果、簡便に使用可能である、ウシの発情に伴う血中LH濃度の上昇を検出可能であるなどのフィードバックが得られた。製品化された場合に「使用したい」との回答の割合が高く、発情検出に有用なツールであることへの期待度が高いと考えられた（Fig. 4(B)）。

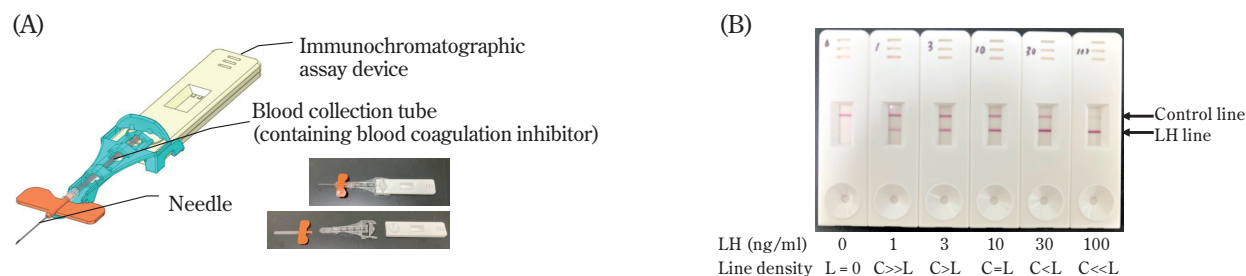


Fig. 3 Development of bovine LH detection kit

(A) Schematic of bovine LH detection kit (B) LH concentration estimation by comparing line density, where C and L indicate the density of the control line and the LH line

ウシLH検出キットの定時人工授精への適用検討

試作品提供希望者のうち、追加試験の申し出があった畜産コンサルタント企業（株式会社Guardian、鹿児島）に試作品を送付し、定時人工授精を実施するタイミングでの血中LHレベルと受胎率の関係性を検討した。

農場で飼育する37頭の定時人工授精時の血中LHレベルを測定したところ、発情が想定通りに進行し、LHサージが完了している個体群（LH = 0）は20頭であった。一方、発情が想定通りに進まずLHサージが完了していない個体のうち、LH濃度が1 ng/ml程度

の群（LH = 1）は12頭、3 ng/ml程度の群（LH = 3）は3頭、10 ng/ml程度の群（LH = 10）は1頭、30 ng/ml程度の群（LH = 30）は1頭であった。それぞれの群の受胎率はLH = 0は75%、LH = 1は50%、LH = 3およびLH = 10は0%、LH = 30は100%であった。また、37頭全体における受胎率は59%であった（**Fig. 5(A)**）。試験結果と推定される発情・排卵のタイムコースの関係を**Fig. 5(B)**に示す。LH = 0の群は想定通りに発情が進行し受胎率は75%（20頭中15頭）であった。一方、血中LH濃度が1-30 ng/mlの群は発情の進行が想定よりも遅れており受胎率は41%（17頭中7頭）であっ

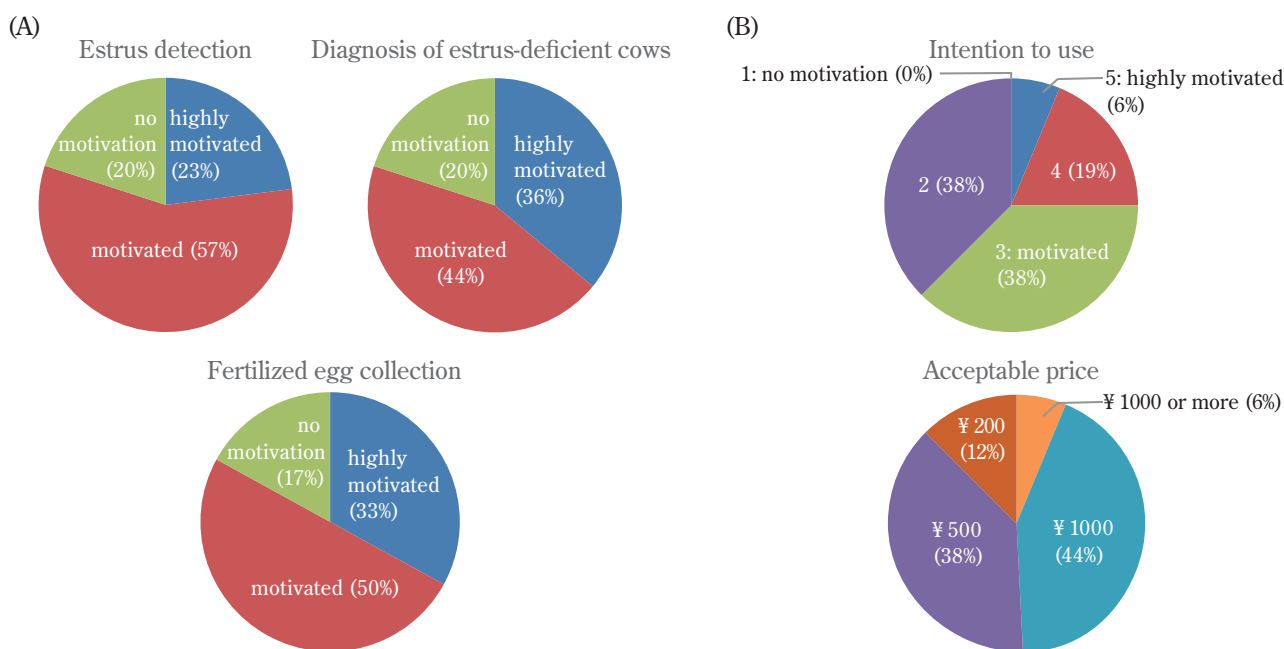


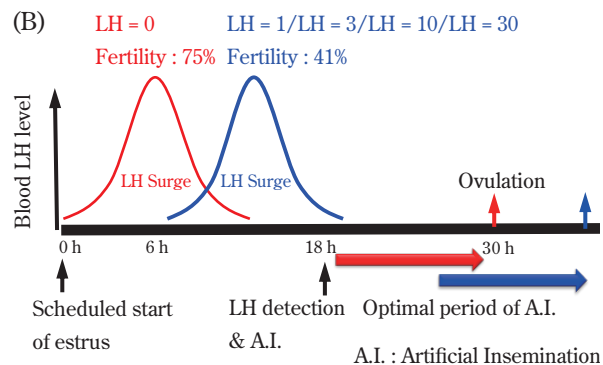
Fig. 4 Survey results for the use of bovine LH detection kit

(A) Potential uses of bovine LH test (B) Impressions of bovine LH detection kit

(A)

LH (ng/ml)	No. of Cows	No. of Pregnant Cows	Fertility
0	20	15	75.0%
1	12	6	50.0%
3	3	0	0.0%
10	1	0	0.0%
30	1	1	100.0%
Total	37	22	59.5%

(B)

**Fig. 5** Application of bovine LH detection kit to scheduled artificial insemination

(A) Relationship between blood LH level and fertility (B) Predicted time course of LH surge and ovulation in the two groups

た。こちらの群については、さらに遅いタイミングで人工授精を実施することにより受胎率が向上する可能性が示唆される。

本結果から、ホルモン処置による発情同期化を行っても発情が想定通りに進行しない個体が多く存在すること、人工授精実施時の血中LH濃度と受胎率に逆相関の関係があることが示された。従来の時間経過だけに頼った人工授精の実施ではなく、人工授精実施前に血中LH濃度を測定し、想定通りに発情が進行している個体を選別して適切なタイミングで人工授精を実施することで受胎率の向上が期待される。LH検出キットは血中LH濃度定量による発情検出に加えて、発情同期化個体を人工授精実施前に選別し受胎率を向上させる手法として広く普及する可能性が十分に期待できると考えられる。

まとめ

われわれは、ウシの繁殖成績向上に寄与することを目指して、ウシLH検出キットを開発した。これにより、獣医師が片手で微量を採血し、数分で血中LHを検出することが可能になった。さらに、検出されるラインの強度比較により血中LH濃度を見積もることも可能である。

ウシLH検出キット試作品を獣医師に提供してアンケートを実施したところ、その有用性が大いに支持された。さらに、排卵同期化処置・定時人工授精法

における授精予定時に使用することで、血中LH濃度から想定通りに発情が進行している個体を選別することにより受胎率の向上が期待される。

おわりに

われわれが開発したLH検出キットは、動物検査薬を製造・販売するメーカーとライセンス契約を締結して製品化される予定である。LH検出キットによりウシの受胎率を向上させ、生産性を上げることにより、農場経営の改善につながる事が期待される。

引用文献

- 1) 家畜改良事業団, “家畜改良技術研究所受胎調査成績”, <http://liaj.or.jp/giken/hanshoku/jyutai.html> (参照2023/3/24).
- 2) 加茂前 秀夫, 家畜人工授精, 245, 1 (2008).
- 3) 大澤 健司, 日本獣医師会雑誌, 65(9), 673 (2012).
- 4) 住友化学(株), WO 2021100715.
- 5) 佐渡 義一, JP 4098796.
- 6) Y. Sado *et al.*, Acta Histochem. Cytochem., 39(3), 89 (2006).
- 7) Y. Kishiro *et al.*, Cell Struct. Funct., 20(2), 151 (1995).
- 8) 住友化学(株), JP 6952219.
- 9) J. Tanikawa *et al.*, 論文投稿準備中.