

Progesterone Monoclonal Antigen 에 의한 妊娠診斷에 관한 研究

金相根 · 小野 育*

忠南大學校 農科大學

Studies on the Pregnancy Diagnosis from Monoclonal Antigen of Progesterone

Kim, Sang Keun and Ono, Hitoshi*

Coll. of Agriculture, Chungnam National University

Summary

This study was carried out to evaluate the ability of clinical application of pregnancy diagnosis based upon the determination of progesterone in milk, utilizing a chymosin inhibitor labelled with progesterone and monoclonal antibody to progesterone, and its compared with progesterone concentrations in the milk were assayed by radioimmunoassay.

1. The progesterone concentrations of the pregnant cows (2.07 ± 0.54 ng/ml) were significantly higher than those of non-pregnant cows (1.04 ± 0.19 ng/ml), and thereafter began to increase and maintained high levels.
2. During 20 to 22 days after artificial insemination, the accuracy of pregnancy diagnosis from monoclonal antigen of progesterone were 92.9% for non-pregnant cows, and 88.5% for pregnant cows.
3. During 20 to 22 days after artificial insemination, the accuracy of pregnancy diagnosis from milk progesterone concentrations were 92.9% for non-pregnant cows (< 3.4 ng/ml), and 92.3% for pregnant cows (≥ 4.0 ng/ml). The average overall accuracy of pregnancy prediction for pregnant and non-pregnant cows were 92.6%.
4. Accordingly, the pregnancy diagnosis from monoclonal antigen of progesterone is thought to be recommendable because this early diagnostic means are simple with accurate result.

I. 緒 論

妊娠牛에서는 妊娠期間이 經過함에 따라 妊娠黃體가 發達함으로써 體內 progesterone 水準이 높아지고 非妊娠牛에서는 黃體가 退化하여 卵胞가 發育하게 됨으로서 體內 progesterone 水準이 낮아지는데, 이러한 progesterone 水準의 增減變化를 利用하여 妊娠與否를 診斷하려는 研究가 많이 遂行되어 왔다 (Bishop et al., 1977; Günzler et al., 1978, 1979; Heap et al., 1973, 1976; Hoffmann et al., 1974; Inaba

et al., 1983; Pennington et al., 1975, 1976; Pope et al., 1977; Robertson et al., 1974; Sato et al., 1985; Sugiyama et al., 1985; Wettemann et al., 1973). 그러나 지금까지 利用되어 온 放射免疫測定法 (radioimmunoassay) 이나 酵素免疫測定法 (enzyme immunoassay) 에 의한 progesterone 의 濃度測定은 高價의 機械設備과 技術과 많은 經費를 要하기 때문에 實際로 酪農家들에 있어 거의 利用이 되지 못하고, 주로 直腸檢査法에 依存하고 있는 實情이다. 또한, 直腸檢査 역시 早期妊娠診斷에 있어서는 適中率이 아주

*日本 帶広畜産大學 (Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)

低調하며, 高度의 熟練된 技術이 要求되어 未熟者에게는 流産과 誤診의 危險性이 內包되어 있어, 授精後 早期에 妊娠診斷이 可能하며 또한 診斷方法이 容易하고 妊娠診斷 適中率이 높은 診斷方法이 要求되고 있는 實情이다.

이러한 要求條件을 充足시키기 위해 開發된 progesterone monoclonal antigen은 progesterone 測定의 指示酵素로서, 乳汁中の progesterone 과 labelling된 chymosin inhibitor를 利用하는 酵素阻害免疫檢定法으로서, 全乳에 이를 加하여 30℃에서 約 1時間정도 培養하면 progesterone濃도가 정해진 域值보다 낮으면 牛乳는 凝固하고, progesterone濃도가 높으면 液體인 狀態로 存在하는데 이를 利用하여 人工授精後 20~22日에 適用하였을때, progesterone濃도가 높은 妊娠牛에서는 凝固되지 않고, progesterone濃도가 낮은 非妊娠牛에서는 凝固되어 早期에 容易하게 妊娠을 診斷하는 것이 可能하다.

이에, 著者は progesterone monoclonal antigen을 利用하여 妊娠을 診斷하고 臨床的 應用性 與否를 試驗하였는 바, 다음과 같은 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 供試牛

供試牛는 日本 帶廣畜産大學 附屬牧場에서 飼育되고 있는 Holstein種 經産乳牛로서 正常的인 性週期를 나타내는 40頭의 乳牛를 供試하였으며, 飼育管理 方法은 當大學 慣行方法에 準하여 飼育하였다.

2. 乳汁採取

檢體인 乳汁은 發情日 및 授精日과 發情과 授精後 各各 2日, 4日, 10日, 17日, 19日 및 20~22日의 아침 搾乳時 供試牛의 四分房으로부터 처음의 몇방울을 버리고, 거의 同量의 乳汁 20cc를 混合한 檢體를 2分하여 4時間 以內에 妊娠診斷을 實施하고 나머지는 radioimmunoassay에 의해 progesterone濃도를 測定하는데 利用하였다.

3. 方法

1) 檢定方法

妊娠診斷을 위한 藥劑는 Fig. 1에서 보는바와 같

Monoclonal antigen of progesterone Reagents

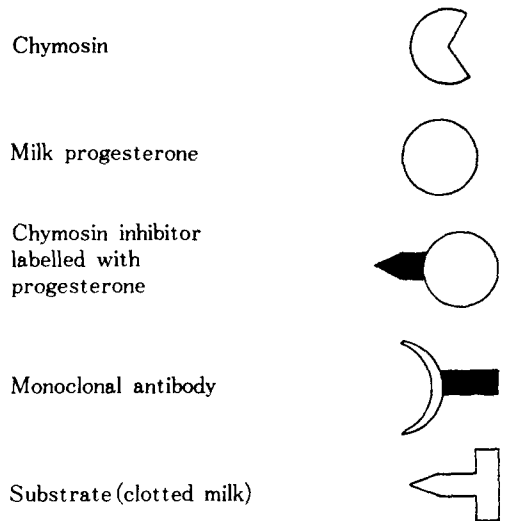


Fig. 1. Cow pregnancy test based upon milk progesterone determination by milk clotting as the end-point

이, 乳汁中の progesterone 測定의 指示酵素로서 chymosin과 progesterone을 labelling한 progesterone monoclonal antigen(Boots-Celltech Diagnostics Ltd, England)으로서, 5ml의 유리병내에 들어 있는 0.2mg의 凍結 乾燥한 progesterone monoclonal antigen에 全乳 2.5ml(乳汁 1ml當 progesterone 4.0ng으로 設定되어 있는)를 加하여 잘 振盪한 후, 30℃의 培養器內에서 約 1時間정도 培養하면서 15分으로부터 2分마다 檢體에 半凝固의 發生與否를 調査하였다.

2) Progesterone의 radioimmunoassay

Progesterone monoclonal antigen에 의한 妊娠診斷 結果와 radioimmunoassay에 의해 測定한 progesterone濃도에 의한 妊娠診斷 結果를 比較코자, radioimmunoassay를 實施하였다. 測定法은 Heap(1973)의 方法에 準하여 實施하였는 바 그 과정은 Fig. 2에 나타난 바와 같다.

3) 妊娠判定

Progesterone monoclonal antigen에 의해 檢體에 半凝固의 發生有無로 診斷하였으며, 이때 妊娠의 判定은 授精後 約 60~70日 사이에 直腸檢査에 의해 判定하였다.

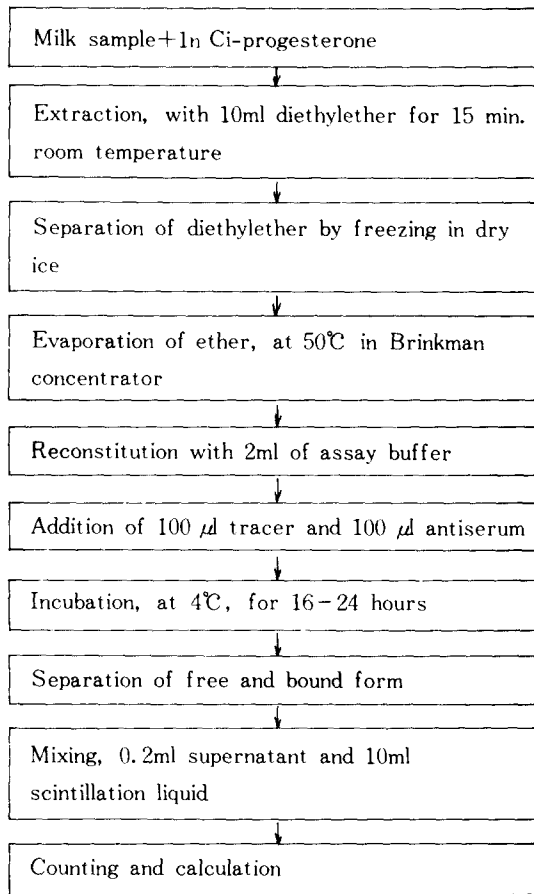


Fig. 2. Flow sheet for radioimmunoassay of progesterone in milk

Ⅲ. 結果 및 考察

1. 妊娠牛와 非妊娠牛의 progesterone 水準

發情日 및 授精日과 發情 및 授精後 各各 2日, 4日, 10日, 17日, 19日 및 20~22日에 採乳한 妊娠牛 및 非妊娠牛의 progesterone 濃度의 變化는 Table 1 및 Fig. 3과 같다.

妊娠牛의 乳汁內 progesterone 濃度는 授精後 增加하기 始作하여 4日에는 $3.91 \pm 0.97 \text{ ng/ml}$, 10日에는 $6.10 \pm 1.12 \text{ ng/ml}$, 17日에는 $8.21 \pm 1.38 \text{ ng/ml}$ 水準이었으며, 19日에는 $7.02 \pm 0.85 \text{ ng/ml}$ 로 약간 減少하였으나 그 以後 20~22日에는 $7.18 \pm 0.94 \text{ ng/ml}$ 水準이었다. 한편, 非妊娠牛에 있어서는, 發情後 2日에는 $1.07 \pm 0.32 \text{ ng/ml}$, 4日에는 $2.75 \pm 0.73 \text{ ng/ml}$ 로 增加하기 始作하여 發情後 10日에는 $4.72 \pm 1.01 \text{ ng/ml}$ 로 急增하였으나, 그 以後에는 減少하여 19日에는 $1.89 \pm 0.73 \text{ ng/ml}$, 다음 發情期인 20~22日에는 $1.04 \pm 0.19 \text{ ng/ml}$ 水準이었다.

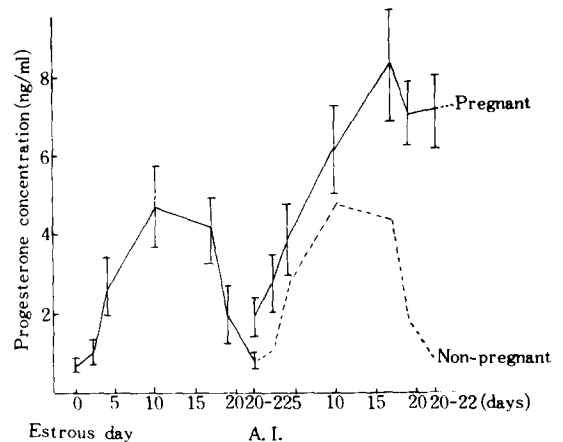


Fig. 3. The changes of milk progesterone concentrations of pregnant and non-pregnant cows

Table 1. The changes of milk progesterone concentrations of pregnant and non-pregnant cows

Non-pregnant cows		Pregnant cows	
Days after estrus	Progesterone concentration (ng/ml)	Days after A. I.	Progesterone concentration (ng/ml)
0	0.68 ± 0.17	0	2.07 ± 0.54
2	1.07 ± 0.32	2	2.77 ± 0.73
4	2.75 ± 0.73	4	3.91 ± 0.97
10	4.72 ± 1.01	10	6.10 ± 1.12
17	4.20 ± 0.87	17	8.21 ± 1.38
19	1.89 ± 0.73	19	7.02 ± 0.85
20-22	1.04 ± 0.19	20-22	7.18 ± 0.94

A. I.: Artificial Insemination

이러한水準은, Laing과 Heap(1971), Heap等(1973) 및 鄭等(1980)이 報告한 妊娠牛와 非妊娠牛의 progesterone水準인 6.05 ± 2.20 ng/ml 와 1.44 ± 0.76 ng/ml, 7.5 ± 0.52 ng/ml 와 4.2 ± 0.92 ng/ml 및 4.2 ± 0.5 ng/ml 와 1.6 ± 0.9 ng/ml 와 비슷한 結果였으며, 특히 妊娠牛에서 非妊娠牛보다 顯著히 높은水準을 나타냈다는 報告와는 一致하였다.

2. Progesterone monoclonal antigen에 의한 妊娠診斷

授精後 20~22日에 採乳한 全乳 2.5ml를 0.2mg의 progesterone monoclonal antigen과 混合하여 잘 振盪한 후, 30°C에서 約 1時間 培養하면서 檢體에 半凝固의 發生有無에 의한 妊娠診斷 結果와 直腸檢査에 의한 結果를 比較하여 妊娠與否를 診斷한 바, 그 結果는 Table 2와 같다.

Progesterone monoclonal antigen에 의해 妊娠을 診斷한 結果, 妊娠으로 判定된 乳牛는 23頭였으나 直腸檢査에 의해 26頭가 妊娠으로 確定되었으므로 88.5%의 妊娠診斷 正確度를 나타냈으며, 非妊娠으로 規定된 乳牛는 13頭였으나 14頭가 直腸檢査 結果 非妊娠으로 確定되었으므로 92.9%의 妊娠診斷 正確度를 나타냈다. 한편 妊娠과 非妊娠의 妊娠診斷 正確度는 各各 88.5%와 92.9%로서 非妊娠의 경우가 약간 높은 正確度를 나타냈다.

3. 乳汁内 progesterone水準에 의한 妊娠診斷

Progesterone水準을 妊娠診斷에 應用코자, 授精後 20~22日에 測定한 乳汁内 progesterone水準은 Table 3에서 보는바와 같이, 妊娠牛와 非妊娠牛의 平均水準은 各各 4.18 ± 0.78 ng/ml, 1.82 ± 0.62 ng/ml 이었다. 乳汁内 progesterone水準에 따른 妊娠

Table 3. Milk progesterone levels in pregnant and non-pregnant cows classified by various physiological condition

Condition	(Unit :ng/ml)	
	Pregnant	Non-pregnant
No. of cows	26	14
Total mean	$4.18 \pm 0.78^*$	$1.82 \pm 0.62^*$
Milk yield		
< 5,000kg	4.03 ± 0.58	1.80 ± 0.68
$\geq 5,000$ kg	4.25 ± 0.87	1.74 ± 0.62
Calving		
< 4th	4.34 ± 0.85	1.89 ± 0.56
≥ 5 th	3.98 ± 1.02	2.10 ± 0.87
Days from calving to 1st estrus		
< 60days	3.82 ± 0.54	1.92 ± 0.93
≥ 61 days	4.12 ± 1.02	1.83 ± 0.83
Days from artificial insemination to return of estrus		
< 60days		1.67 ± 0.75
61-90days		1.89 ± 0.96

*: Mean \pm Standard error.

與否를 決定하는 限界水準은 妊娠牛에서는 4.0ng/ml 以上, 非妊娠牛에서는 3.4ng/ml 以下水準이었다. 이때 乳汁内 progesterone水準에 根據한 妊娠診斷 結果를 直腸檢査 結果와 比較하여 分類한 바 그 結果는 Table 4와 같다.

乳汁内 Progesterone濃度에 의해 妊娠으로 規定한 4.0ng/ml 以上에 屬하는 乳牛는 24頭였으나 直腸檢査 結果 26頭가 妊娠으로 確定되었으므로 92.3%의 妊娠診斷 正確度를 나타냈으며, 非妊娠으로 規定한 3.4ng/ml 以下에 屬하는 乳牛는 13頭였으나

Table 2. The accuracy of pregnancy diagnosis from monoclonal antigen of progesterone at 20 to 22 days after artificial insemination

Result of rectal palpation		Pregnancy test (ng/ml)			Total
		Clot or semi-clot	Doubtful	Non-clot	
		Pregnancy	Doubtful	Non-pregnancy	
Pregnancy	No. of cows	23	2	1	26
	%	(88.5)	(7.7)	(3.8)	(100)
Non-pregnancy	No. of cows	1		13	14
	%	(7.1)		(92.9)	(100)
Total	No. of cows	24	2	14	40

Table 4. The accuracy of pregnancy diagnosis from milk progesterone concentrations at 20 to 22 days after artificial insemination

Result rectal palpation		Limit level of pregnancy test (ng/ml)			Total
		< 3.4	3.4 - 3.9	≥ 4.0	
		Non-pregnancy	Doubtful	Pregnancy	
Pregnancy	No. of cows		2	24	26
	%		(7.7)	(92.3)	(100)
Non-pregnancy	No. of cows	13		1	14
	%	(92.9)		(7.1)	(100)
Total	No. of cows	13	2	25	40

Table 5. Comparison of pregnancy diagnosis rate for monoclonal antigen of progesterone and milk progesterone concentrations at 20 to 22 days after artificial insemination

Result of rectal palpation		Methods of pregnancy diagnosis		Total
		Monoclonal antigen of progesterone	Milk progesterone concentrations	
Pregnancy	No. of cows	23	24	26
	%	(88.5)	(92.3)	(100)
Non-pregnancy	No. of cows	13	13	14
	%	(92.9)	(92.9)	(100)
Total	No. of cows	36	37	40

直腸檢査 結果 14頭가 非妊娠으로 確定 되었으므로 92.9%의 非妊娠診斷 正確度를 나타냈다.

本 試驗結果는 Günzler 等(1975), Hoffmann 等(1976), Pennington 等(1970) 및 鄭等(1980)이 各各 2 ng/ml, 6.4ng/ml, 2ng/ml 및 3ng/ml 以下를 非妊娠牛로 看做했을때 94~100%의 正確度를 나타냈다는 結果와 類似한 成績이었으며, 妊娠牛에서보다 非妊娠牛의 診斷成績이 더욱 正確하다고 報告한 點은 一致하였다.

4. 妊娠診斷法の 檢討

乳汁를 통한 progesterone monoclonal antigen에 의한 妊娠診斷法과 progesterone 濃度에 의한 妊娠診斷法을 比較한 成績은 Table 5와 같다.

Progesterone monoclonal antigen 및 progesterone 濃度에 의한 妊娠診斷의 結果, 妊娠牛의 判定의 경우 各各 88.5%, 92.3%, 非妊娠牛의 判定의 경우 各各 92.9%, 92.9%로서, progesterone 濃度에 의한 妊娠診斷法이 progesterone monoclonal antigen에 의한 妊娠診斷法보다 多少 높은 成績이었으

나, 比較的 높은 妊娠診斷度를 나타냈으며, 特히 妊娠牛에서보다 非妊娠牛에서 診斷正確度가 높았다.

이러한 結果로 미루어 볼때, progesterone monoclonal antigen에 의한 妊娠診斷法과 progesterone 濃度에 의한 妊娠診斷法 모두가 早期에 妊娠을 診斷할 수 있는, 比較的 適中率이 높은 妊娠診斷法으로서, 特히, progesterone monoclonal antigen에 의한 妊娠診斷法은 特別한 機械設備나 技術의 必要없이 簡便하게 妊娠을 診斷할 수 있어, 酪農家들이 現場에서 應用이 容易하여 勸奨할만한 妊娠診斷法으로 思料된다.

IV. 摘要

乳汁中の progesterone 測定의 指示酵素로서 chymosin 과 progesterone 을 labelling 한 progesterone monoclonal antigen에 의해 授精後 20~22日에 妊娠을 診斷하고, 乳汁内 progesterone 水準에 의해 診斷한 結果와 直腸檢査 結果와 比較하여 臨床의 應用性 與否를 檢討하였는 바, 그 結果는 다음과 같

다.

1. 授精後 20~22日의 妊娠牛의 乳汁內 progesterone濃度는 2.07 ± 0.54 ng/ml로서 非妊娠牛의 1.04 ± 0.19 ng/ml보다 越等히 높았으며, 점차 增加하기 始作하여 높은 水準을 維持하였다.

2. 授精後 20~22日에, progesterone monoclonal antigen에 의한 妊娠診斷에서 妊娠 및 非妊娠乳牛는 各各 23頭, 13頭였으나, 直腸檢査에 의해 26頭, 14頭가 各各 妊娠 및 非妊娠으로 判定되어, 88.5%, 92.9%의 妊娠診斷 正確度를 얻을 수 있었다.

3. 授精後 20~22日의 乳汁內 progesterone濃度에 의한 妊娠診斷에서 3.4 ng/ml以下를 非妊娠牛, 4.0 ng/ml以上을 妊娠牛로 했을때, 妊娠診斷 正確度는 各各 92.9%, 92.3%로서, 非妊娠牛에서 더욱 正確性이 높았으며, 妊娠 및 非妊娠牛에 대한 全體의 平均 正確度는 92.6%였다.

4. Progesterone monoclonal antigen에 의한 妊娠診斷法은, 早期에 簡便하게 妊娠을 診斷할 수 있어, 酪農家들이 現場에서 應用이 容易하여 勸奨할 만한 妊娠診斷法으로 判定되었다.

V. 引用文獻

1. Bishop, C.A., C.P. Bond and C. Roberts. 1977. Early diagnosis of non-pregnancy in cattle: The first eighteen months of a commercial service. A.B.A., 45(1):47.
2. Günzler, O.L., H. Körndorfer, R. Lohff and B. Hoffmann. 1975. Practical experience with the estimation of progesterone in the milk for determining the fertility status of cows. A.B.A., 43(10):524.
3. Günzler, O., L. Körndorfer, R. Hamburger and B. Hoffmann. 1978. The importance of the milk-progesterone-test for fertility control and diagnosis of infertility in the bovine. VIIIth International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination.
4. Günzler, O., E. Rattenberger and A. Grolach. 1979. Milk progesterone determination as applied to the conformation of oestrus, the detection of cycling and as an aid to veterinarian and biotechnical measures in cows. Br. Vet. J., 135-149.
5. Heap, R.B., M. Gwyn, J.A. Laing and D.E. Walters. 1973. Pregnancy diagnosis in cows: Changes in milk progesterone concentration during the oestrus cycle and pregnancy measured by a rapid radioimmunology. J. Agr. Sci., 81:151.
6. Heap, R.B., R.J. Holdworth, T.E. Gadsby, J.A. Laing and D.E. Walters. 1976. Pregnancy diagnosis in the cow from milk progesterone concentration. A.B.A., 45(1):49.
7. Hoffmann, B., R. Hamburger, O. Günzler, L. Körndorfer and H. Lohoff. 1974. Determination of progesterone in milk applied for pregnancy diagnosis in the cow. Theriogenology, 2:1-2, 21-28.
8. Hoffmann, B., R. Günzler, R. Hamburger and W. Schmidt. 1976. Milk progesterone as a parameter for fertility control in cattle: Methodological approaches and present status of application. Ger. Br. Vet., 132: 469-476.
9. Inaba, T., Y. Nakajima, N. Matsui and T. Imori. 1983. Pregnancy diagnosis in cows: A comparison of the method of ultrasonic linear electronic scanning and estimation of plasma progesterone. Japan. J. Anim. Reprod., 29(4):178-181.
10. Laing, J.A. and R.B. Heap. 1971. The concentration of progesterone in the milk of cows during the reproductive cycle. Br. Vet. J., 127, 19.
11. Pennington, J.A., S.L. Spahr, and J.R. Lodge. 1975. Factors affecting progesterone in milk for pregnancy diagnosis in dairy cattle. Br. Vet. J., 132:496.
12. Pennington, J.A., S.L. Spahr, and J.R. Lodge. 1977. Pregnancy diagnosis in dairy cattle by progesterone concentration in

- milk. A.B.A., 45(3):176.
13. Pope, G.S., I. Majzlik, P.J.H. Ball, and J.D. Leaver. 1977. Use of progesterone concentrations in plasma and milk in the diagnosis of pregnancy in domestic cattle. A.B.A., 45(1):50.
 14. Robertson, H.A. and G.T. King. 1974. Plasma concentrations of progesterone, oestrone, oestradiol-17B and oestrone sulphate in the pig at implantation during pregnancy and at parturition. J. Reprod. Fertil., 40:133-141.
 15. Sato, S., G. Tomida, E. Takahashi, and M. Sugawara. 1985. Changes in serum progesterone levels and subsequent fertility in cows after artificial insemination. Japan. Vet. J., 38:506-509.
 16. Sugiyama, S., T. Nakao, N. Tsunoda, and K. Kawata. 1985. An enzymeimmunoassay of serum oestrone sulphate and its application to early pregnancy diagnosis in pigs. Br. Vet. J., 141:60.
 17. Wettemann, R.P. and H.D. Hafs. 1973. LH, prolactin, estradiol and progesterone in bovine blood serum during early pregnancy. J. of Anim. Sci., 36(1):51-56.
 18. 鄭英彩, 金昌根. 1980. 소의 多頭分娩에 關한 研究. II. 牛乳의 Hormone 分析法에 의한 소의 早期妊娠診斷에 關한 研究. 韓國畜産學會誌, 22(1): 7-15.
 19. 金教準, 金相根. 1980. 乳牛의 早期妊娠診斷에 關한 研究. 大韓獸醫學會誌 20(2): 135~141.