

## 性周期ならびに妊娠期におけるウシ乳汁 中の黄体ホルモン測定について

阿部知行\*・上村俊一\*・佐藤邦忠\*

小野 齊\*・三宅 勝\*

(受理: 1980年8月12日)

### Measurement of Progesterone Concentration in Milk Obtained from Cows during the Estrous Cycle and Pregnancy

Tomoyuki ABE\*, Shunichi KAMIMURA\*, Kunitada SATO\*,  
Hitoshi ONO\* and Masaru MIYAKE\*

#### 摘 要

帯広畜産大学附属農場の繋養牛20頭を用い、夕方搾乳時の混合乳中の黄体ホルモンの抽出方法を検討するとともに、性周期および妊娠期の判定に利用可能かどうかを調べた。

##### 1) 黄体ホルモンの抽出方法

A法: 乳汁 0.1 ml をエチルエーテル 2.0 ml で抽出し、抽出液を乾固した後、100%メタノール 1.0 ml で溶出し、その 0.1 ml をRIA に用いた。

B法: 10倍希釈乳汁 0.1 ml をエチルエーテル 2.0 ml で抽出し、抽出液全量をRIA に用いた。

C法: 10倍希釈乳汁 0.1 ml をヘキサン 2.0 ml で抽出し、抽出液全量をRIA に用いた。

A法、B法では硫酸添加後、遠心分離してもBound型とFree型を分離できない例が多かったが、C法ではそのようなことはなく、操作は最も簡単であった。

##### 2) 性周期における黄体ホルモンの変動

A法による発情期、黄体期の平均値はそれぞれ 2.80 ng/ml, 9.68 ng/ml, B法では 3.80 ng/ml, 7.76 ng/ml, C法では 2.99 ng/ml, 6.99 ng/ml で、A法とC法による乳汁中黄体ホルモンと血漿中黄体ホルモンとの間に相関関係を認めた ( $P < 0.05$ )。

##### 3) 妊娠期における黄体ホルモンの変動

乳汁中黄体ホルモンは発情期に低値を示し、妊娠期には高値を持続した。すなわち、A法では発情期、妊娠期の平均値はそれぞれ 3.98 ng/ml, 9.51 ng/ml, B法では 2.53 ng/ml, 6.24 ng/ml, C法では 2.32 ng/ml, 7.11 ng/ml であった。A法、B法共に乳汁中黄体ホルモンと血漿中黄体ホルモンの間に相関関係を認めた (A法, B法それぞれ  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

\* 帯広畜産大学獣医学科家畜臨床繁殖学教室

\* *Laboratory of Veterinary Obstetrics and Gynecology, Oaihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Hokkaido, Japan. OSO.*

## 1. 緒 言

1973年、HEAPら<sup>14)</sup>がRIAによる乳汁中黄体ホルモン測定法を確立してから、諸外国ではすでにウシの妊娠診断<sup>13,15,16,18,20)</sup>や分娩後の黄体機能の判定<sup>4,21)</sup>などに応用されてきている。一方、わが国における乳汁中ステロイドホルモンの定量はまだ実用の域に達しておらず、わずかに宮沢<sup>22,23)</sup>が乳汁中コルチゾールについて、森ら<sup>24)</sup>が黄体ホルモンについて報告しているにすぎない。

今回、著者はウシの性周期の判定および早期妊娠診断の目的で乳汁を採取し、牧野<sup>20)</sup>の方法によるRIAにより黄体ホルモンを測定したので、その結果を報告する。

## 2. 材料と方法

### 1) 試験材料

試験期間は昭和52年8月より53年12月までで、帯広畜産大学附属農場に繋養中のホルスタイン種乳牛20頭を試験に用いた(表-1)。これらは临床上、生殖器その他に異常を認めないものである。牛群はルーズバーンで飼育され、搾乳はロータリー式ハリンボーン型ミルク

ングパーラーで朝夕2回行われている。

乳汁は午後4時30分からの夕方搾乳時に、よく攪拌した個体毎の混合乳から約200mlをポリエチレン製容器に採取し、その5mlを滅菌ポリエチレン製スピッツ管に入れ、防腐剤(蒸留水100mlに重クロム酸カリウムと塩化第二水銀をそれぞれ0.05g溶解した液)0.05mlを加え、ホルモン測定まで4°Cに保存した。

また乳脂肪測定用として100mlの乳汁を200mlポリエチレン製容器に入れ、10%ホルマリン溶液3mlを添加したのち4°Cに保存した。

試験牛のうち、妊娠した10頭中7頭(No. 1~7)については、人工授精を実施した日(0日とする)から7日毎に6回、その後は30日毎に妊娠210日まで乳汁および血液を採取した。残りの3頭(No. 8, 9および10)については、人工授精後42日まで3日毎に乳汁のみを採取した。受胎しなかった10頭のうち、6頭(No. 11~16)は発情が回帰するまで7日毎に乳汁を採取し、残りの4頭中3頭(No. 17, 18および19)は3日ないし7日毎に、1頭(No. 20)は毎日乳汁を採取した。なお非妊娠牛のうち、4頭(No. 11, 12, 14および20)からは乳汁

表-1 試 験 材 料

No.	牛番号	年齢 (才)	産歴	最終分娩 (年月日)	最終授精 (年月日)	妊否
1	540	8	5	52- 8-17	52-11-24	+
2	703	6	3	52- 8-23	52-11-28	+
3	708	6	3	52- 9-29	52-11- 4	+
4	776	4	2	52- 7- 6	53- 1-17	+
5	795	4	2	52-10-17	52-12-28	+
6	589	7	5	52- 6-28	52-11-24	+
7	869	3	1	52- 9-30	53- 1-17	+
8	612	7	4	53- 7- 6	53-10-15	+
9	650	7	5	53- 7-19	53- 9-13	+
10	818	4	1	52- 2-28	53- 8-26	+
11	504	9	6	52- 8-23	53-11-21	-
12	605	7	4	52-10- 7	53- 1-11	-
13	624	7	4	52- 5-25	53- 6- 9	-
14	749	5	2	52- 1-15	53- 6-20	-
15	625	7	4	52- 5-27	53- 3-27	-
16	792	4	2	52-10-27	53- 5-23	-
17	870	3	1	53- 2- 2	53-12- 1	-
18	511	9	6	53- 4-17	53-11- 7	-
19	806	4	2	53- 1-10	53- 7-19	-
20	620	7	4	52- 7-28	53- 9-15	-

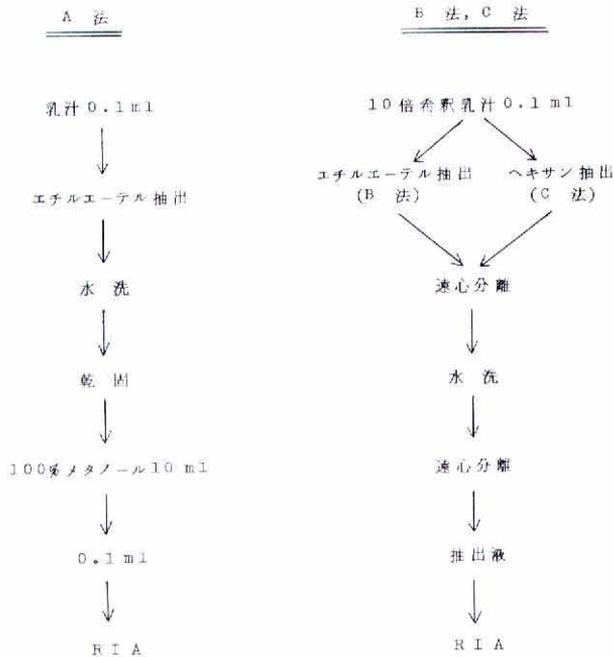


図-1 乳汁中黄体ホルモンの抽出方法

採取に加えて血液もあわせて採取した。

血液は頸静脈よりヘパリン加真空採血管を用いて約 10 ml 採取し、血漿分離剤ブルート Z を入れ遠心分離後、血漿を滅菌ポリエチレン製スピッツ管に移し、ホルモン測定まで  $-20^{\circ}\text{C}$  に保存した。

なお、乳脂肪の測定はデンマーク製迅速脂肪測定機ミルコテスター MK II を用いて行い、試験牛の乳房炎の診断は PL テスターで行った。また試験牛は人工授精後 40~60 日に直腸検査法により妊娠を確認した。

## 2) 黄体ホルモンの測定

乳汁中黄体ホルモン (以下 m-p) の抽出方法は、図-1 に示すごとく、次の三方法を検討した。

A 法: 加温して充分混和した乳汁 0.1 ml に抽出溶媒としてエチルエーテル 2.0 ml を加え、30 秒間強く振盪、静置後下層を除去し、再蒸留水 0.1 ml を加え 15 秒間振盪した。次にエーテル層を他の試験管に移し乾固させ、これに 100%メタノールを 1.0 ml 加え 30 秒間振盪した。これより 0.1 ml を別の試験管に移し、RIA の試料とした。

B 法: 再蒸留水で 10 倍希釈した乳汁より 0.1 ml をとり、エチルエーテルを 2.0 ml 加えて 30 秒間抽出を行い、遠心分離後 (2000 r. p. m. 2~3 分間) 下層を除去し、再蒸留水 0.1 ml を加え 15 秒間水洗し、再度遠心

分離後 (2000 r. p. m. 2~3 分間) エーテル層を他の試験管に移し、これを RIA に供した。

C 法: エチルエーテルのかわりにヘキサンで抽出した以外は B 法と同様に操作した。

m-p と血漿中黄体ホルモン (以下 p-p) の測定は、乳汁 0.01 ml のエチルエーテルおよびヘキサン抽出物について、また p-p は血漿 0.1 ml のエチルエーテル抽出物について RIA (牧野氏法<sup>20)</sup> で測定した。回収率は A 法, B 法および C 法でそれぞれ 71%, 91%, 89% で、p-p は 80% であった。標準曲線は 0~500pg の範囲で使用した。

## 3. 結 果

### 1) m-p および p-p

m-p は抽出方法のいかんにかかわらず p-p と同様に発情期に低く、黄体期、妊娠期に高値を示した。

(1) A 法による m-p および p-p

妊娠牛 5 頭の発情期の m-p は、表-2 のごとく、 $3.98 \pm 0.26$  (m  $\pm$  S. E.) ng/ml であった。人工授精後 7 日には  $8.88 \pm 0.58$  ng/ml と上昇し、以後 120 日あるいは 210 日まで  $7.89 \pm 0.84 \sim 12.37 \pm 2.14$  ng/ml の間を維持した。m-p と p-p を比較した結果、前者は後者の約 4

表-2 妊娠牛 No. 1~5 の A 法による m-p と p-p の平均値

授精後日数	m-p (ng/ml)	p-p (ng/ml)
0	$3.98 \pm 0.26$	$0.59 \pm 0.06$
7~ 8	$8.88 \pm 0.58$	$2.46 \pm 0.18$
14~ 15	$10.61 \pm 1.81$	$2.41 \pm 0.09$
21~ 22	$8.19 \pm 0.79$	$2.13 \pm 0.17$
28~ 30	$10.15 \pm 1.39$	$2.34 \pm 0.25$
35~ 37	$8.86 \pm 1.24$	$2.45 \pm 0.21$
39~ 44	$12.37 \pm 2.14$	$2.80 \pm 0.39$
60~ 63	$8.70 \pm 0.50$	$2.33 \pm 0.26$
88~ 91	$7.89 \pm 0.84$	$2.24 \pm 0.23$
118~121	$10.20 \pm 0.94$	$2.73 \pm 0.56$
148~150	$8.71 \pm 0.61$	$2.37 \pm 0.36$
180	$9.49 \pm 1.13$	$3.09 \pm 0.68$
210	$10.04 \pm 0.88$	$3.97 \pm 1.90$

(m  $\pm$  S. E.)

表-3 非妊娠牛 No. 12 と No. 14 の A 法による m-p と p-p の平均値

授精後日数	m-p (ng/ml)	p-p (ng/ml)
0	3.17±0.94	0.85±0.14
7	10.09±2.07	2.86±0.22
14	11.58±1.17	2.81±0.51
21	3.31±0.69	0.70±0.06

(m±S.E.)

表-4 妊娠牛 No. 6 と No. 7 の B 法による m-p と p-p

授精後日数	m-p (ng/ml)		p-p (ng/ml)	
	No. 6	No. 7	No. 6	No. 7
0	2.14	2.91	0.25	0.25
7	5.71	6.37	0.93	1.60
14	5.60	7.03	1.60	2.36
21	6.59	5.93	2.31	—
28	4.73	6.26	2.03	2.48
35	5.06	6.92	2.00	2.55
42	6.70	7.91	2.44	2.64
60	6.70	6.81	1.73	1.86
90	6.59	5.28	1.90	2.18
120	6.70	6.15	2.29	0.64
148	5.93	—	2.61	—
179	—	6.37	—	2.69
209	—	5.82	—	1.88

倍高く、両者の間に相関関係を認めた ( $r=0.74$ ,  $p<0.05$ )。

発情が回帰した2頭では、表-3のごとく、発情期、7日、14日、21日(発情)の m-p はそれぞれ  $3.17\pm 0.94$ ,  $10.09\pm 2.07$ ,  $11.58\pm 1.17$ ,  $3.31\pm 0.69$  ng/ml であった。これらの値と p-p とでは相関関係を認めた ( $r=0.99$ ,  $p<0.05$ )。

(2) B 法による m-p および p-p

妊娠牛2頭の m-p は、表-4のごとく、発情期にそれぞれ 2.14, 2.91 ng/ml で、人工授精後7日から148日あるいは209日までは 4.73~7.91 ng/ml の値を示した。m-p は p-p の約3.5倍高かったが、性周期中の変化は p-p とほぼ同様で両者の間に相関関係を認めた ( $r=0.72$ ,  $p<0.01$ )。

(3) C 法による m-p

妊娠牛3頭の平均 m-p は、表-5のごとく、発情期 2.32 ng/ml, 3日 2.99 ng/ml, 6日には 6.56 ng/ml と増加し、以後40日あるいは42日まで 5.90~8.43 ng/ml の値を示し、発情期の値まで低下することはなかった。

(4) A 法, B 法および C 法による m-p の比較

妊娠牛では、表-6のごとく、A 法による平均 m-p は、B 法のそれより約 3 ng/ml 高いレベルで変化した。C 法による平均 m-p は、発情期と42日の値が B 法よりわずかに低いほかは、A 法と B 法のほぼ中間であった。

表-5 妊娠牛 No. 8, 9 および 10 の C 法による m-p

授精後日数	No. 8	No. 9	No. 10	平均 (ng/ml)
0	2.58	2.70	1.69	2.32
3	4.05	3.23	1.69	2.99
6~7	7.42	7.19	5.06	6.56
9	8.09	7.64	9.55	8.43
12	7.08	8.99	7.19	7.75
15	9.44	9.10	5.96	8.17
18	9.66	6.29	5.84	7.26
21	6.74	9.44	5.06	7.08
25	—	7.08	—	7.08
27~28	11.20	5.73	6.18	6.36
30	—	6.63	5.17	5.90
33	—	6.97	—	6.97
35	7.42	—	—	7.42
40~42	7.98	6.41	4.49	6.29

表-6 妊娠牛の抽出方法別 m-p の平均値 (ng/ml)

授精後日数	A 法	B 法	授精後日数	C 法
0	3.98	2.53	0	2.32
7~8	8.88	5.89	3	2.99
14~15	10.61	6.32	6~7	6.56
21~22	8.19	6.26	9	8.43
28~30	10.15	5.50	12	7.75
35~37	8.86	5.99	15	8.17
39~44	12.39	7.31	18	7.26
60~63	8.70	6.76	21	7.08
88~91	7.89	5.94	25	7.08
118~121	10.20	6.43	27~28	6.36
148~150	8.71	5.93	30	5.90
180	9.41	6.37	33	6.97
210	10.04	5.82	35	7.42
			40~42	6.29

表-7 非妊娠牛 No. 18 の抽出方法別 m-p (ng/ml)

授精後日数	A 法	B 法	C 法
0	3.52	3.57	1.69
7	7.04	6.04	10.11
14	10.00	8.57	10.00
21	7.11	8.90	8.88
28	9.11	9.34	9.10
35	8.38	5.93	6.41
40	2.82	4.03	2.58

非妊娠牛では、表-7のごとく、A 法、B 法および C 法とも同様の变化を示した。すなわち、発情期は 1.69~3.57 ng/ml で、以後 28 日までは 6.04~10.11 ng/ml と高値を示したが、35 日からは低値となり、40 日には 2.58~4.03 ng/ml となった。

## 2) 脂肪率、PL テストと m-p

No. 6 では脂肪率と m-p との間に相関関係を認め ( $r=0.58$ ,  $p<0.05$ ), また No. 12, No. 14 および No. 17 の発情期においては、脂肪率が高い時には m-p も高い傾向を認めたが、他の多くの例では脂肪率と m-p の明らかな関係は認められなかった。

乳房炎罹患牛の乳汁と m-p の関係を知るため、試験牛全頭に PL テストを実施したところ、No. 10 と No. 18 が軽度の陽性を示した。これらの m-p を A 法により測定したが、測定自体に影響を与えることなく、m-p は測定可能であった。

## 4. 考 察

A 法、B 法および C 法によって測定された m-p の変動によって、試験牛の性周期ならびに妊娠期の判定が可能であった。また A 法、B 法、C 法によるそれぞれの m-p の変動は p-p のそれとよく一致していた。以下、測定方法、性周期および妊娠期とホルモン値の関係ならびにウシの繁殖分野における応用について考察を述べる。

### 1) 測定方法

A 法、B 法および C 法の 3 法とも m-p の測定は可能であるが、それぞれ次のような長所と短所があった。すなわち、A 法では抗血清を添加後、白濁を生ずる例がみられたことである。牧野<sup>20)</sup>は、硫酸アンモニウム液 (硫酸) の添加により、標識抗原-抗体結合物 (Bound 型) と遊離標識抗原 (Free 型) を分離できると報告しているが、A 法では分離できない例が多かった。しかし室

温で 4 時間以上静置すると、Bound 型は液面付近に集まり、下層の Free 型を回収することができた。この方法は、乾固操作が 2 回で時間がかかる、誤って Bound 型を吸う、あるいは振動により再び白濁してしまうなど問題が多い。

B 法では脂肪を減らす目的で 10 倍希釈した乳汁を用いたが、抗血清添加後やはり白濁する例がみられた。ただし A 法と異なり、遠心分離により Bound 型は上層に浮き Free 型の回収は容易で、A 法に比較し簡略化された方法といえる。しかしエチルエーテルは脂肪に富む乳汁の黄体ホルモン抽出には不適當であると思われた。このように脂肪が測定自体に悪影響を与える例として牧野<sup>20)</sup>は、血漿中に油状物質が多いと硫酸を添加しても蛋白の沈殿が不充分であると述べているが、同じことが乳汁についても証明されたわけである。

これに対し、C 法ではヘキサンを用いたため遠心分離により Bound 型は沈殿し、Free 型の回収が容易であった。本法は最も推奨しうる方法と考える。

乳汁中の脂肪を除く方法として、SCHIAVO ら<sup>28)</sup>、THIBIER ら<sup>31)</sup>、森ら<sup>24)</sup>は凍結法を用いているが、これは操作が煩雑なりえ、測定に長時間を要する。現在、広く用いられている測定法は GADSBY ら<sup>3)</sup>の方法である。この方法はカラムによる純化と抽出操作そのものを省き、デキストラン被覆炭末により B:F 分離を行う極めて簡便な直接 RIA である。m-p 測定に関する報告はすべて B:F 分離にデキストラン被覆炭末を用いており、硫酸を用いた例は森らと著者だけである。

### 2) 乳汁の脂肪率と m-p

血液採取と異なり、乳汁では採取時間が極めて重要であることは HOFFMANN と HAMBURGER<sup>14)</sup>、SCHIAVO ら<sup>28)</sup>をはじめ多くの研究者の一致するところである。これは採取する材料によって脂肪率が異なり、脂肪率が m-p に影響するためであるが、たとえば POPE ら<sup>29)</sup>は collecting jar からの採取の仕方によっては脂肪率が 1%以下から 6%前後に変動し、脂肪率と m-p との間に相関関係を認めている。BALL と POPE<sup>9)</sup>、HOFFMANN ら<sup>15,16)</sup>、GLINTHER ら<sup>10)</sup>も脂肪率と m-p に相関関係があるとしているが、今回の実験で、1 例ではあるがこの傾向を認めた。また HEAP ら<sup>13)</sup>は、m-p が低い時は脂肪率と相関関係があると述べているが、今回、発情期の m-p と脂肪率でそのような傾向を認めたのは、わずか 3 例であった。著者の結果で m-p と脂肪率との間に相関関係を認める例が少なかったのは、collecting jar の攪

搾の程度、乳脂肪測定用乳汁の保存状態、乳脂肪測定機の信頼性などに問題があったためと考える。

測定に用いる乳汁は研究者により異なり、午後搾乳時の混合乳<sup>18,17,25,28</sup>、後搾り乳<sup>10</sup>、朝搾乳後2時間の乳汁<sup>9,10</sup>、一乳区から得た後搾り乳のクリーム<sup>21</sup>などであるが、一般には午後搾乳時の合乳が用いられているので、今回もこのような乳汁を材料とした。

過去に乳房炎罹患牛の m-p については報告されていない。今回、乳汁の PL テストの結果が m-p にどのような影響があるかを調べたが、軽度の PL テスト陽性乳は m-p に対してほとんど影響を与えないという結果であった。また乾乳期の m-p の報告もないため、著者は妊娠148日で機械搾乳中止後29日目のウシより手搾りで乳汁を採取し、乳区別に A 法によって測定した。その結果、7.04~8.59 ng/ml と乳区による差はなく、乾乳期の乳汁でも m-p の測定は可能であることがわかった。乳房の乳区別の m-p には差がないという点は DOBSON と FITZPATRICK<sup>9</sup> の報告と一致していた。

### 3) 妊娠期における m-p

A 法による平均 m-p は発情期に  $3.98 \pm 0.26$  ng/ml、妊娠期には  $7.89 \pm 0.84 \sim 12.37 \pm 2.14$  ng/ml であった。DARLING<sup>ら</sup><sup>9</sup>は妊娠牛4頭の午後混合乳を gas-chromatography で測定した結果、発情期は 5.0 ng/ml 以下、妊娠期は 6.4~16.0 ng/ml であったと報告し、DOBSON と FITZPATRICK<sup>9</sup> は9カ月にわたり221頭から混合乳289検体を採取し、直接 RIA により測定したところ、妊娠牛は 5~20 ng/ml 平均 9.0 ng/ml、非妊娠牛は 1.0~6.0 ng/ml 平均 3.5 ng/ml であったと述べている。A 法による m-p は、これらの報告とほぼ一致するものであった。

B 法による平均 m-p は発情期を除いて、C 法による m-p の範囲に入るため、両者の値はほぼ類似するものと思われた。C 法による平均 m-p は、発情期と発情後3日ではそれぞれ 2.32, 2.99 ng/ml で、妊娠期では 5.90~8.43 ng/ml を示した。これらの m-p は HEAP<sup>ら</sup><sup>11</sup> が発情牛および妊娠牛の前搾り乳を直接 RIA で測定した値と似た値であった。

### 4) 性周期における m-p

A 法による平均 m-p は発情期に 2.80 ng/ml、黄体期には 9.68 ng/ml、B 法では、それぞれ 3.80 ng/ml、7.76 ng/ml、C 法では 2.99 ng/ml、6.99 ng/ml であった。各法とも6~7日から上昇し、9~16日に最大となり、以後減少した。GARTLAND<sup>ら</sup><sup>8</sup>は15頭の混合乳を

RIA で測定し、発情期に 1.8 ng/ml、発情後5日より増加し10~11日に 10.1 ng/ml と最高値に達し、17日から減少すると報告している。著者の結果をこれと比較すると発情期には若干高いが、黄体期はほぼ同様の成績であった。なお非妊娠牛 No. 18 における m-p が3法ともほぼ同様な変動を示したのは同じウシについて測定方法を比較したためであり、妊娠期で A 法が B 法および C 法より高値を示したのは測定方法の相違というより、むしろ個体が違っていたためと考えられた。

従来報告によれば、m-p は p-p より高値を示すと言われているが、著者の報告もほぼこれに一致していた。この理由は当初、HEAP<sup>ら</sup><sup>12</sup>によって乳汁中の未知の代謝産物が交叉反応を起こすためであろうと言われ、ついで DARLING<sup>ら</sup><sup>9</sup>は、HEAP の言う代謝産物というのは 5 $\alpha$ -androstandione と 5 $\alpha$ -pregnandione であるとした。SLOTIN<sup>ら</sup><sup>30</sup>は山羊では乳腺で P 合成が可能であると報告しているが、HOFFMANN と HAMBURGER<sup>14</sup>、HEAP<sup>ら</sup><sup>12</sup>は、乳牛の乳腺での P 合成はないとし、HEAP<sup>ら</sup><sup>12</sup>は m-p が p-p より高いのは、交叉反応を起こす物質の存在よりも単に脂質がステロイドを溶かすという作用によるのではないかと結論づけている。

### 5) ウシの繁殖分野における応用

人工授精後、妊娠したウシの m-p は発情期の値まで低下することなく高値を持続する。このことから人工授精後18~23日に乳汁を採取し m-p を測定することにより、妊娠したか否かを診断することが可能である。測定材料としては、すでに述べたように午後搾乳時の混合乳がよく、搾乳直前の乳汁は使用しないほうがよい。ドイツ、イギリスでは、すでに m-p によるウシの妊娠診断が実用の段階に入っている。すなわち、HOFFMANN<sup>ら</sup><sup>14</sup>は333頭の人工授精後20日の後搾り乳を用いた結果、11 ng/ml 以上を妊娠、2 ng/ml 以下を非妊娠とし、それぞれ適中率は78%、100%であった。PENNINGTON<sup>ら</sup><sup>22</sup>は370頭について人工授精後19~29日の間に採取した混合乳を直接 RIA で測定し、8 ng/ml 以上を妊娠、それ以下を非妊娠と区分したところ、非妊娠牛の適中率は98%、妊娠牛のそれは20日の乳汁で76%、23日と合わせると85%であったという。また BISHOP<sup>ら</sup><sup>23</sup>は早期妊娠診断を行い、95%以上の適中率を報告している。肉牛での初めての報告は MACFARLANE<sup>ら</sup><sup>19</sup>のもので、交配後22日の手搾り乳を用い、4 ng/ml 以上を妊娠、3 ng/ml 以下を非妊娠とし、境界を 3.2 ng/ml とした。その結果、適中率はそれぞれ94.6%、100%であ

ったが、40日後と90日後に直腸検査を行ったところ受胎率は80.4%、75.0%と低下していた。彼らはその原因を胚、胎児の死亡によるものとした。

ウシで早期妊娠診断を行う場合、ある程度の誤診は免れない。その原因として最も重要なものは早期胚、胎児の死である。ROBERTS<sup>27)</sup>によると、早期に妊娠と診断されたウシの平均8%が妊娠60日までに流産しているといわれ、妊娠診断の時期が早いほど誤診率は高くなる。m-pによる妊娠診断の誤りについて、HOFFMANNら<sup>16)</sup>は、性周期の長い個体、早期胚の死、生殖器の病的変化、材料採取の誤りなどが原因となると述べている。

著者の結果から、人工授精後21日のm-pが高値を示したものは14頭(No. 1~10, 15, 16, 18および20)であったが、直腸検査により妊娠と診断されたものは11頭(No. 1~10および16)、約79%であった。しかし11頭中1頭(No. 16)はその後発情が回帰し、流産が疑われる例であった。残りの3頭(No. 15, 18および20)については次のことが考えられた。すなわち、No. 15は人工授精後21日に12.6 ng/ml(A法)と高値を示したが、35日発情が回帰し(4.83 ng/ml)、早期胚の死が疑われた。No. 18は人工授精後21日に8.88 ng/ml(C法)と高値を示しながら、40日には2.58 ng/mlと減少し、直腸検査からも非妊娠と診断され、早期胚の死が考えられる例であった。No. 20はm-p(C法)およびp-pの変動からは、流産、胚の死、silent heatなどは認めず、黄体遺残症の疑いのある例であった。結局m-pの高い14頭中No. 20を除く13頭(約93%)は受胎と考えられる例であった。

このほか、MATHERら<sup>21)</sup>はクリーム中のPにより分娩後の性周期を調べ、BULMANとLAMMING<sup>3,4)</sup>は同じく分娩後のm-pを測定し、無発情牛の発見に効果あげている。

以上の結果、m-pの測定は早期妊娠診断、繁殖障害牛早期発見に役立ち、ウシの繁殖に大きく貢献するものと思われる。

稿を終るにあたり試験材料の採取に御協力いただいた本学附属農場の各位、ならびに抗血清を提供された帝國臓器製薬株式会社、乳脂肪測定にあたり御指導をいただいた帯広畜産大学祐川金次郎教授に深謝いたします。

#### 引用文献

- 1) BALL, P. J. H. & POPE, G. S. (1976): Measurement of concentration of progesterone in fatfree cow's milk: Its potential value in studies of reproduction. *Proc. Soc. Endocr.*, **69**, 40-41.
- 2) BISHOP, C. A., BOND, C. P. & ROBERTS, C. (1976): Progesterone in milk and pregnancy diagnosis. *Brit. vet. J.*, **132**: 529-537.
- 3) BULMAN, D. C. & LAMMING, G. E. (1976): Radioimmunoassay of progesterone in milk for the diagnosis and treatment of subfertility in dairy cows. *Proc. Soc. Endocr.*, **71**: 52.
- 4) BULMAN, D. C. & LAMMING, G. E. (1977): Cases of prolonged luteal activity in the nonpregnant dairy cow. *Vet. Rec.*, **100**: 550-552.
- 5) DARLING, J. A. B., LAING, A. H. & HARKNESS, R. A. (1974): A survey of the steroids in cow's milk. *J. Endocr.*, **62**: 261-297.
- 6) DOBSON, H. & FITZPATRICK, R. J. (1976): Clinical application of the progesterone-in-milk test. *Brit. vet. J.*, **132**: 538-542.
- 7) GADSBY, J. E., HEAP, R. B., HENVILLE, A. & LAING, J. A. (1974): A semi-automated technique for the estimation of progesterone in cow's milk and its application to pregnancy diagnosis. *Physiol. Soc.*, **242**: 3-5.
- 8) GARTLAND, P., SCHIAVO, J., HALL, C. E., FOOTE, R. H. & SCOTT, N. R. (1975): Detection of estrus in dairy cows by electrical measurements of vaginal mucus and by milk progesterone. *J. Dairy Sci.*, **59**: 982-985.
- 9) GINTHER, O. J., NUTI, L., WENTWORTH, B. C. & TYLER, W. J. (1974): Progesterone concentration in milk and blood during pregnancy in cows. *Proc. Soc. exp. Biol.*, **146**: 354-357.
- 10) GINTHER, O. J., NUTI, L. C., GARCIA, M. C., WENTWORTH, B. C. & TYLER, W. J. (1976): Factors affecting progesterone concentration in cow's milk and dairy products. *J. Anim. Sci.*, **42**: 155-159.
- 11) HEAP, R. B., LAING, J. A. & WALTERS, D. E. (1973): Pregnancy diagnosis in cows; Changes in milk progesterone concentration during the oestrous cycle and pregnancy measured by a rapid radioimmunoassay. *J. Agric. Sci.*, **81**: 151-157.

- 12) HEAP, R. B., HENVILLE, A. & LINZELL, J. L. (1975): Metabolic clearance rate, production rate, and mammary uptake and metabolism of progesterone in cows. *J. Endocr.*, **66**: 239-247.
- 13) HEAP, R. B., HOLDSWORTH, R. J., GADSBY, J. E., LAING, J. A. & WALTERS, D. E. (1976): Pregnancy diagnosis in the cow from milk progesterone concentrations. *Brit. vet. J.*, **132**: 445-464.
- 14) HOFFMANN, B. & HAMBURGER, R. (1974): Determination of progesterone in milk by radioimmunoassay and its application for the diagnosis of bovine fertility. *Acta endocr. Suppl.*, **184**: 90.
- 15) HOFFMANN, B., HAMBURGER, R., GÜNZLER, O., KÖRNDORFER, L. & LOHOFF, H. (1974): Determination of progesterone in milk applied for pregnancy diagnosis in the cow. *Theriogenology* **2**: 21-28.
- 16) HOFFMANN, B., GÜNZLER, O., HAMBURGER, R. & SCHMIDT, W. (1976): Milk-progesterone as a parameter for fertility control in cattle; Methodological approaches and present status of application in Germany. *Brit. vet. J.*, **132**: 469-476.
- 17) LAING, J. A. & HEAP, R. B. (1971): The concentration of progesterone in the milk of cows during the reproductive cycle. *Brit. vet. J.*, **127**: 19-22.
- 18) LAING, J. A. (1976): Progesterone assays of milk and the control of infertility. *Brit. vet. J.*, **132**: 534-537.
- 19) MACFARLANE, J. S., BOOTH, J. M., DEAS, D. W. & LOWMAN, B. G. (1977): Pregnancy test and evaluation of embryonic and fetal mortality based on progesterone concentrations in fore-milk. *Vet. Rec.*, **100**: 565-566.
- 20) 牧野拓雄 (1973): 性ステロイドホルモンの Radioimmunoassay. *日内分泌誌*, **49**: 629-646.
- 21) MATHER, E. C., CAMPER, P. M., VAHDAT, F., WHITMORE, H. L. & GUSTAFSSON, B. G. (1978): Assessment of ovarian activity in the postpartum dairy cow by use of a milk progesterone assay. *Theriogenology*, **10**: 119-129.
- 22) 宮沢清志・白井和哉 (1975): 乳汁中に分泌されるコルチゾールに関する研究. I. 乳汁中コルチゾール測定法および乳汁中コルチゾール値について. 第80回日本獣医学会講演要旨, p. 129.
- 23) 宮沢清志・白井和哉 (1976): 乳汁中に分泌されるコルチゾールに関する研究. II. 分娩前後の母牛血中, 乳汁中および仔牛血中コルチゾール値について. 第82回日本獣医学会講演要旨, p. 159.
- 24) 森 純一・宮塚常夫・辻村信一・仮屋堯由・神部昌行 (1977): 血中ならびに乳汁中の Progesterone 濃度測定による牛および豚の早期妊娠診断法. 第66回日本畜産学会大会講演要旨, p. 74.
- 25) PENNINGTON, J. A., SPAHR, S. L. & LODGE, J. R. (1976): Factors affecting progesterone in milk for pregnancy diagnosis in dairy cattle. *Brit. vet. J.*, **132**: 487-496.
- 26) POPE, G. S., MAJZLIK, I., BALL, J. H. & LEAGER, J. D. (1976): Use of progesterone concentrations in plasma and milk in the diagnosis of pregnancy in domestic cattle. *Brit. vet. J.*, **132**: 497-506.
- 27) ROBERTS, S. J. 編著 (1978): 獣医産科・繁殖学—その診断と治療— 監訳 白井和哉, 河田啓一郎. 学窓社, p. 14.
- 28) SCHIAVO, J. J., MATUSZCZAK, R. L., OLTENACU, E. B. & FOOTE, R. H. (1974): Milk progesterone in postpartum and pregnant cows as a monitor of reproductive status. *J. Dairy Sci.*, **58**: 1713-1716.
- 29) SHEMESH, M., AYALON, N., SHALEV, E., NERYA, A., SCHINDLER, H. & MILGUIR, F. (1978): Milk progesterone measurement in dairy cows: Correlation with estrus and pregnancy determination. *Theriogenology*, **9**: 343-352.
- 30) SLOTIN, C. A., HEAP, R. B., CHRISTIANSEN, J. M. & LINZELL, J. L. (1970): Synthesis of progesterone by the mammary gland of the goat. *Nature*, **225**: 385-386.
- 31) THIBIER, M., FOURBET, J. F. & PAREZ, M. (1976): Relationship between milk progesterone concentration and milk yield, fat and total nitrogen content. *Brit. vet. J.*, **132**: 477-486.

## Summary

The first purpose of this study was to develop a method for the extraction of milk progesterone; the second was to determine whether it is possible to know the different phases of the estrous cycle and to predict pregnancy from the investigation of milk progesterone levels.

Full milk samples were collected from twenty Holstein-Friesian cows during the afternoon milking in Obihiro University Dairy Farm.

### 1. Extraction of free progesterone in milk.

Method A: Using 0.1 ml of milk sample, 2 ml of ethylether was added and was mixed thoroughly. The ethylether extract was evaporated to dryness and then 1 ml of 100% methanol was added and mixed intensely. An aliquot of 0.1 ml of the resulting mixture was used for RIA by MAKINO's method.

Method B: 0.1 ml of milk sample was diluted with 10 ml water and 0.1 ml of the mixture was extracted, and 2 ml of ethylether was added. The whole volume of ethylether extract was used for RIA by MAKINO's method.

Method C: An equal volume of hexane was used for extraction instead of ethylether following the steps of method B.

It was very difficult to separate bound and free progesterone after adding ammonium sulfate in methods A and B. On the contrary, in method C,

the bound progesterone readily settled leaving a clear solution of free progesterone. Therefore, it seems that method C is the most recommendable technique.

### 2. Variation of milk progesterone levels during the estrous cycle in 10 cows.

The mean progesterone levels during the estrous and luteal phase using methods A, B and C were 2.80 and 9.68 ng/ml, 3.80 and 7.76 ng/ml, 2.99 and 6.99 ng/ml respectively. There was a positive correlation between plasma progesterone and milk progesterone levels in methods A and C ( $p < 0.05$ ).

### 3. Variation of milk progesterone levels during pregnancy in 10 cows.

Progesterone levels in milk were low during the estrous phases, but maintained high levels during pregnancy. The mean progesterone levels in milk during the estrous period and pregnancy using methods A, B and C were 3.98 and 9.51 ng/ml, 2.53 and 6.24 ng/ml, 2.32 and 7.11 ng/ml, respectively.

Progesterone levels were higher in milk than in plasma throughout pregnancy. There was also a close correlation between plasma progesterone and milk progesterone levels using methods A and B ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$  respectively).

From these results it seems that not only determination of the different phases of the estrous cycle but also early pregnancy diagnosis of cows can be made by measuring the progesterone levels in milk.