

生乳中ステロイドホルモン濃度に及ぼす飼養環境の影響調査 および地域別および季節別の各種市販牛乳中 および各種乳製品中ステロイドホルモン濃度の調査

鹿児島大学農学部獣医学科 小島 敏之

＜研究目的及び内容＞

前年度調査の結果、脱脂乳中ステロイドホルモン濃度と妊娠ステージ間、脱脂乳中ステロイドホルモン濃度と乳量間で強い相関が認められなかったが、バルク内の生乳中ステロイドホルモン濃度は、生理的空胎牛、受胎牛（平均濃度が他の群に比べて高い）、不受胎牛、交配後の妊否不明牛の構成割合に影響されることが示唆された。今年度は、例数を増やして上記を再確認するとともに、農場間で（つまり飼養環境によって）平均ステロイドホルモン濃度レベルが異なる傾向がみられたことから、この原因についての調査を行う。また、分娩後の乾物摂取量の高低が血中ステロイドホルモン濃度レベルに影響を及ぼすとの興味深い研究報告があることから、個別別乾物摂取量（摂取エネルギー量）、妊否および乳量と生乳中ステロイドホルモン濃度の影響も調査する。ただ、個別別飼料摂取量を正確に把握できる農場は限られていることから、事前に農場の飼養形態に関して調査することが必要である。前年度は生乳を脱脂乳としてステロイドホルモン濃度の測定を行ったが、生乳は全乳として利用されることが多いことから、全乳での測定も考慮することが必要と思われた。

今年度は新たに、各種市販牛乳（生乳、加工乳、低脂肪乳）中のステロイドホルモン濃度について地域（生乳生産地）および季節の影響を調べる。また、各種乳製品（チーズ、ヨーグルト）中ステロイドホルモン濃度を調査する。

前年度は、ステロイドホルモンとしてプロゲステロンとエストラジオール 17β の2種類を採りあげたが、エストロンサルフェートの測定系を確立して、妊娠期後半のステロイドホルモン濃度推移を調査する。また、生乳の中に含まれるIGF-1濃度の時間分解蛍光免疫法による測定系確立を目指す。

本研究の当初の目的は、上記の通りであったが、下線部分については実行できたが、その他の箇所は実施できず、計画変更とせざるを得なかった。研究計画書には提出時点で参画することが未定であったため記載できなかったが、独立行政法人畜産草地研究所との共同研究（研究課題：高泌乳牛の乳期に伴う乳汁中性ステロイドホルモン動態の解明、共同研究契約書を別紙添付）を実施したことが計画変更の理由である。畜産草地研究所は、本研究の意義を理解して快くサンプル提供に応じて頂いた。その共同研究では、当該共同研究に参画する延べ12県の畜産研究機関（初産牛G：宮城、福島、茨城、埼玉、岐阜、熊本の計6県24頭、経産牛G：茨城、神奈川、千葉、愛知、石川、富山の計6県36頭）で飼養されている乳牛計60頭の分娩後2週間後から乾乳まで生乳を週3回（ただし、受胎確定後は週1回）採材して当研究室まで配送されることになった。そのサンプル容器の準備・送付ならびに生乳中の性ステロイドホルモン濃度測定で繁忙を極めたため、他の調査項目を実施する余裕がなかった。しかし、収集できる生乳サンプル数は前年度よりも圧倒的に多く、かつ同一個体から継続的に採取することになり、泌乳期間中の濃度推移、受

胎の影響等を詳細に調べることが可能となる。かつ本体の研究が「高泌乳牛の飼養試験」であるため、飼養条件も正確に把握できるメリットがあり、今年度の研究目的を十分達成するものと思われる。昨年度の反省から、生乳を採材しても採材時点での個体別の情報が正確に把握されていないと、得られた測定値の価値は大幅に減じてしまうことがわかっていたので、正確な情報、データ採取という点で上記の共同研究に参画させていただいた意義は高かったと考える。

<<予備実験 牛生乳中の性ステロイドホルモン濃度に及ぼすサンプル処理の影響>>

本予備実験に供試した生乳サンプルは、鹿児島県内の酪農家で飼養されている乳牛（ホルスタイン種）のうち20頭から前搾り乳と後搾り乳各40mlを、独立行政法人家畜改良センター宮崎牧場の乳牛（ホルスタイン種）から月1回の頻度で計4回各20頭から各25mlを採材した。生乳と同時に、生乳採材直後の乳牛の尾静脈からヘパリン加採血管に血液7mlを採取して、血漿中プロジェステロン濃度およびエストラジオール17β濃度の測定に供した。生乳は、予め最終濃度0.3%になるようにアジ化ナトリウムを含むサンプル瓶に採取された。

本予備実験は、生乳中の性ステロイドホルモン濃度に影響を及ぼす要因を調査することを目的とした。主に、保存・融解法およびホモジナイズ処理の影響について検討した。昨年度の研究成果報告会において、「ヒトが摂取するのは全乳が圧倒的に多いことから、脱脂乳中濃度ではなく全乳中濃度を測定するほうが望ましいのでは」との評価委員の意見を受けて、今年度はすべて全乳中の濃度を測定することとした。全乳中濃度と脱脂乳中濃度との関係は、昨年度の成果の通り、プロジェステロンおよびエストラジオール17βの両濃度において、脱脂乳中濃度の方が全乳中濃度に比べて低値を示すが、両者の相関は有意であった。ただし、プロジェステロンに比べてエストラジオール17βは、それほど高い相関を示さなかった。血漿中と全乳中の性ステロイドホルモン濃度の関係については、プロジェステロンでは有意で高い正の相関関係（ $r=0.81$ 、 $P<0.0001$ ）が認められたが、エストラジオール17βでは有意な相関はみられなかった（ $r=0.036$ 、 $P=0.789$ ）。

昨年度提起された問題点のひとつに、前搾り乳ではそれに含まれる性ステロイドホルモン濃度が低いことが懸念されたので、今年度、再度前搾り乳と後搾り乳中の性ステロイドホルモンの濃度を測定した。その結果、前搾り乳はプロジェステロンにおいて有意に後搾り乳よりも低く（ $P=0.008$ ）、同様にエストラジオール17βにおいても有意に後搾り乳よりも低値であることが再確認できた（ $P<0.01$ ）。この結果を受けて、今年度は採材協力機関に前搾り乳を採取しないように依頼した。前搾り乳は搾乳されてミルクタンク中に入ることが通常ではあり得ないので、中間乳（最適な材料だが、採取することは実際上不可能）により近いと思われる後搾り乳との比較結果を優先することとした。前搾り乳中の性ステロイドホルモン濃度が低いことは自明のこととなっているようであるが、その理由は解明されていない。しかし、前搾り乳は、本来、乳頭清掃作業の終了直後（40～50秒以内）に採取した乳をいうが、サンプル採取の前に刺戟を与えてしまうと射乳が始まってしまい、乳槽内で混和されて、前搾り乳かどうかわからなくなる問題もあるが、本予備実験ではこの点について緻密な検討を加えなかった。

保存法を検討する目的は、今年度の実験計画では大量（5,000<）のサンプルを取り扱うことが予想されるので、採材協力機関毎のサンプル間の保存期間の影響を最小限に留めることが可能な保存方法を採用する必要があった。成書によれば、アジ化ナトリウムを適当な濃度で添加すれば冷蔵で半年間は測定値が大きく変動しないと言われているが、予備実験ではこの点をまず検証

することとした。採材日を1日目として冷蔵開始後11日目、21日目および28日目に同一サンプル中の性ステロイドホルモン濃度を測定した結果、プロゲステロン濃度では11日目までは採材日と有意差はみられなかったが、21日目、28日目と冷蔵期間が長くなるに従って有意に高くなった。また、エストラジオール17β濃度においては、有意差は認められなかったが徐々に濃度は高くなる傾向を示した。これらの結果より、今年度実施する研究の採材条件等を勘案すると冷蔵保存は適さないことが示唆された。冷蔵保存に代わる保存法として考えられる凍結保存法は、全乳の保存に不適との一般的常識であるが、全サンプルの測定前条件を均一にするためには致し方ないと考えられた。家畜改良センター宮崎牧場の乳牛5頭から採材した生乳を用いて実施した予備実験で得られたデータを表-1および表-2に示した。プロゲステロン濃度およびエストラジオール17β濃度のいずれにおいても、同一牛から採取した生乳の対照（冷蔵保存採材当日測定）の数値と各試験区の数値は、いずれも有意で高い正の相関関係が認められた。同一サンプルについて、採材日に測定した濃度と採材当日に凍結（-30℃あるいは-80℃の冷凍庫に入れることによって凍結させる2通り）して当日融解（温水散布による融解、室温融解、冷蔵庫内融解の3通り）して測定した濃度を比較した結果（表-1および表-2）、プロゲステロン濃度は凍結融解後に低くなる傾向があるが、エストラジオール17β濃度は凍結融解後に高くなる傾向を示したが、凍結融解条件によってこの傾向は一定しない結果となった。この原因ははっきりしないが、融解後に水と脂肪が分離することと関係があると考えられる。一方、ホモゲナイズ処理をして凍結融解したサンプルでは、プロゲステロン濃度については無処理の場合と大きな差は認められず、ホモゲナイズ処理の影響を受けないと判断された。しかし、エストラジオール17β濃度に関しては、ホモゲナイズ処理によって無処理の場合に比べて顕著に濃度が上昇した。ホモゲナイズ処理による脂肪球の破碎が、2つの性ステロイドホルモン濃度に対して異なる影響を及ぼした原因を突き止める必要がある。

今後も大量のサンプルの測定が考えられるので、冷蔵保存採材当日測定の結果と整合性がある結果を得ることができる事前処理（ホモゲナイズ処理による脂肪球の微細化など）、凍結・融解方法を究明する必要がある。参画県によって凍結方法（-30℃冷凍庫に入れるか、-80℃冷凍庫に入れるか）が一定していない可能性があり、この点についての調査も必要と考えられる。なお、本年度においては、昨年度使用することはなかった防腐剤であるアジ化ナトリウムを添加して、機関による採材から凍結保存までの経過時間およびその間の保管温度の違いによる生乳の腐敗程度が濃度に及ぼす影響を最小限に留めるように努めた。

表-1. 牛生乳中のプロジェステロン濃度に及ぼす凍結・融解及びサンプル処理の影響

	血漿	対照	無処理						ホモゲナイズ処理					
			-30 室	-30 冷	-30 温	-80 室	-80 冷	-80 温	-30 室	-30 冷	-30 温	-80 室	-80 冷	-80 温
1	2.78	6.8	6.14	4.36	5.28	5.72	4.22	4.83	5.22	3.80	4.67	4.54	4.39	4.95
2	3.84	7.78	6.2	6.14	6.06	7.17	6.3	6.76	6.58	6.13	6.01	6.23	5.89	5.96
3	4.92	10.5	10.2	10.5	10.6	11.3	9.27	12.2	11.7	9.44	9.54	9.29	9.34	10.6
4	5.01	10.1	9.67	9.29	8.98	9.61	8.52	8.38	8.87	8.67	9.22	9.07	7.76	9.07
5	.25	.46	0.5	0.48	0.48	0.44	0.47	0.49	0.49	0.49	0.57	0.45	0.45	0.46

表-2. 牛生乳中のエストラジオール17β濃度に及ぼす凍結・融解及びサンプル処理の影響

	血漿	対照	無処理						ホモゲナイズ処理					
			-30 室	-30 冷	-30 温	-80 室	-80 冷	-80 温	-30 室	-30 冷	-30 温	-80 室	-80 冷	-80 温
1	2.75	5.67	9.41	6.18	9.78	4.15	4.24	4.01	8.64	11.7	9.08	5.24	6.43	6.02
2	2.26	6.22	8.07	4.15	6.33	5.17	5.03	5.38	7.74	8.58	12.7	17.2	20.0	14.1
3	2.63	5.98	9.76	7.35	6.86	6.28	5.43	6.74	11.3	8.24	10.6	9.63	12.9	10.5
4	2.57	25	33.6	37.3	32.1	23	25.8	23.2	57.9	43.9	42.2	35.9	51.5	33.8
5	1.15	6.13	5.83	4.85	10.1	7.69	5.25	6.13	5.37	7.6	18.9	10.2	8.38	8.93

表-1 および表-2 の対照とは、冷蔵保存採材当日測定の結果を指す。

<研究の方法> 初産牛G、経産牛Gの供試牛一覧別紙添付

本研究遂行のための生乳は、上記共同研究に参画している延べ12県計60頭の乳牛（すべてホルスタイン種）から得る計画である。分娩後2週間経過時から受胎確認までは週3回、受胎確認後から乾乳開始までは週1回採材した後、当研究室に冷凍の宅配便で配送された（される予定である）。実験開始前に、当研究室から各県の担当者に採材用サンプル容器1本当たり約0.12gのアジ化ナトリウムを入れた滅菌済み50mlコニカルチューブ（前半はポリスチレン製、後半はポリプロピレン製）に牛個体番号ラベルを貼付して配送した。採材に当たっては、生乳40mlを上記のアジ化ナトリウム（最終濃度0.3%）入りサンプル容器に取り、軽く攪拌して、できるだけ速やかに凍結していただくように依頼した。また、上記の結果から、採材には前搾り乳を避けて頂くようにも依頼した。しかし、朝搾り時か夕方搾り時かは特に指定しなかった。2010年3月19日現在で、約1,700サンプル（49頭）について両ホルモン濃度の測定が終了している。しかし、分娩後2週間目の採材開始から受胎確認を経て、乾乳（次期分娩約60日前から）直前までの生乳を採材してホルモン濃度を測定するためには、畜産草地研究所との共同研究が終了する2010年9月30日までかかる見込である。

<<測定系>>

本研究では、昨年度と同様、生乳中ならびに血漿中の性ステロイドホルモン濃度を測定する手段として、時間分解蛍光免疫測定法（以下、TR-FIA）を選択した。この方法は、ユーロピウム

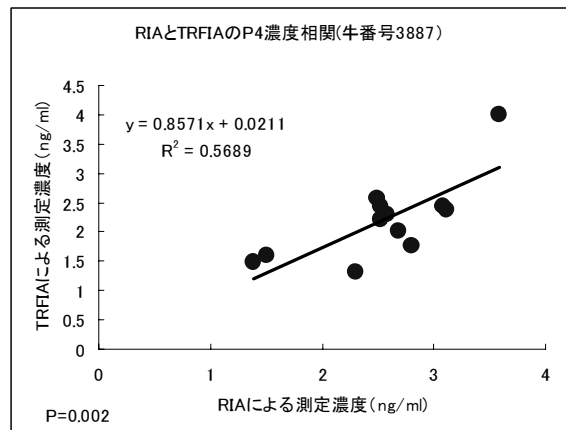
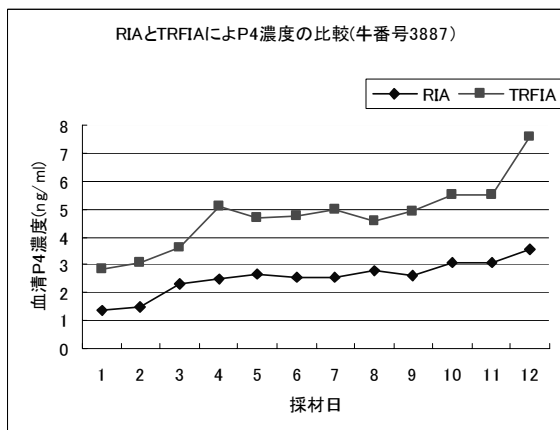
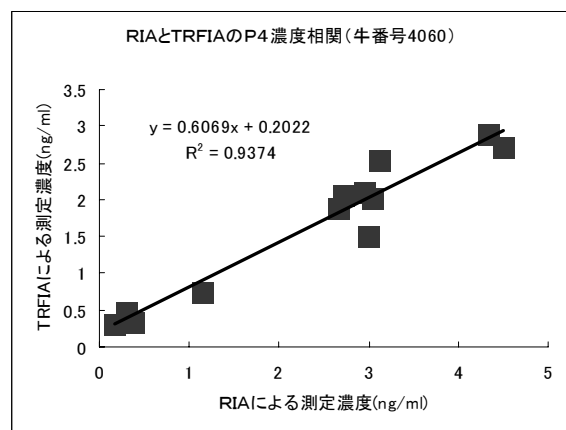
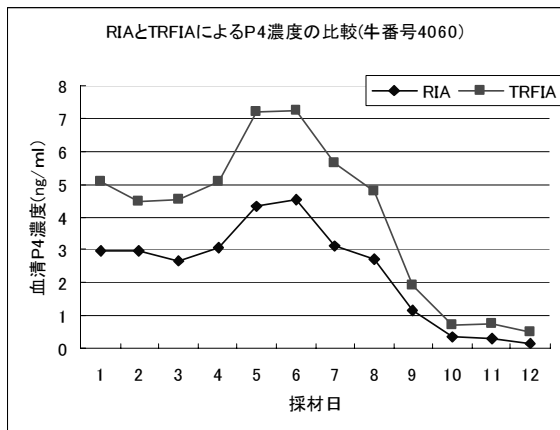
(以下、Eu) を標識物質としたもので、ランタノイド金属の波長だけをマルチラベルリーダーにより測定するもので、簡便かつ高感度である。従来は、主としてラジオイムノアッセイ (RIA) やエンザイムノアッセイ (EIA) 等の免疫測定法が用いられてきた。RIAは、放射性同位元素を標識物質として使用する高感度測定システムであるが、放射性同位元素を使用することから、被爆の危険性や施設管理などの面でデメリットも多い。また、EIAは、酵素を標識物質として用いており、RIAと比較し簡便ではあるが低感度という問題があった。

TR-FIAは非常に高感度であるので、サンプルから脂溶性物質を予め抽出しておく必要がないと推し量られたため、本研究では、すべてのサンプル分析に当たって、抽出操作を経ずに行う直接測定を採用した。測定の実際については、昨年度の成果報告書に記載してあるので、省略する。測定には2重測定を行い、変動係数が15%を越えた場合には、-30℃で保存しておいたサンプルを用いて再測定を行った。

<結果および考察>

<<アッセイ系の信頼度>>

本研究で用いたアッセイ系の信頼度は、今まで汎用されていたRIAによる同一サンプルの測定結果を比較することによって可能と思われる。下図の通り、



TR-FIAにより測定したプロゲステロン濃度は、両サンプルともRIAによる測定濃度に比べて高くなる傾向があるが、相関はともに有意であった。RIAアッセイ系の測定内および測定間の変動は、それぞれ7.3%および10.1%の範囲内であった。なお、RIA法を用いる場合には、ジエチルエーテルを用いて脂溶性物質の抽出を行っている。

<<生乳測定の信頼度>>

昨年度は生乳材料として脱脂乳を用いTR-FIAにより両ホルモン濃度を測定した結果、いずれも血漿サンプルと脱脂乳サンプルは非常に相関が高いことが示された。プロゲステロンについては、血漿中濃度と脱脂乳中濃度がほぼ等しいが、エストラジオール17βについては、脱脂乳中濃度が総体的に血漿中濃度よりも低い値を示した。全乳を用いた今年度は、プロゲステロン濃度は血漿中濃度と高い相関が得られたものの、エストラジオール17β濃度では全乳中濃度と血漿中濃度との間に有意な相関は得られなかった。

<<測定結果>>

協定試験では、初産牛を用いた試験グループと経産牛を用いた試験グループの2グループが設置された。初産牛グループでは、埼玉県を除く5県計20頭からすでに採材を開始している。経産牛グループでは、参画県6県すべてから計29頭において採材が始まっている。協定試験では、高泌乳牛の飼養試験を目的として添加物の効果判定が主目的であるが、われわれの試験ではそれらの試験区設定に囚われずに解析した。

全体を総じて、個体間差はあるものの、分娩後しばらくの間は、全乳中プロゲステロン濃度およびエストラジオール17β濃度のいずれにおいても低濃度で推移する（卵巣静止の状態）。その後、卵巣の活動再開に伴う卵胞の発育によるエストラジオール17β濃度の上昇ピークに続いて、排卵したことを示すプロゲステロン濃度の上昇ピークがみられる。茨城県初産331が典型例で、分娩後60日間の全乳中性ステロイドホルモン濃度は、静止状態にある卵巣の動きを如実に反映していると考えられる。いずれにしても、エストラジオール17β濃度の上昇ピークが先行し、引き続いて排卵が起こった場合にはプロゲステロン濃度の上昇ピークが後に続くという図式はほぼ全頭においてみられた。その後、人工授精により受胎した牛では、プロゲステロン濃度が持続的に高レベルを示した。一方、人工授精を試みるが受胎に至らない牛では、エストラジオール17β濃度とプロゲステロン濃度が周期性を持ってピークを繰り返している。この意味では、全乳中性ステロイドホルモン濃度は、血漿中濃度とかなり高い相関を示しているように思えるが、既述のように、エストラジオール17β濃度においては血漿中と全乳中において有意な正の相関関係はみられない。添付のホルモン濃度推移を示す図において、および千葉県31を除く二重線で囲ってあるものは受胎した試験牛を、愛知県127および千葉県31は一旦受胎したが、その後流産が確認された試験牛を指す。流産をすると黄体が退行するので、当然ながら全乳中プロゲステロン濃度は低下する。また、受胎している牛の中でも、プロゲステロン濃度が比較的高濃度（20ng/ml）で安定しているものと、低濃度（10ng/ml）で上下動を反復するもののが存在した。この差が何を意味するかは、現時点では不明である。この他に、明らかに受胎していると思われる高レベルでのプロゲステロン濃度持続を示す牛が数頭いるが、この報告書をまとめる時点で

県からの受胎報告は届いていない。初産牛と経産牛との間で、全乳中性ステロイドホルモン濃度の推移に差が認められるかどうかは、本試験が完了した時点で解析できるものと考えられる。臨床繁殖学的には、凍結した全乳を用いて性ステロイドホルモン濃度を測定することによって、卵巣活動の再開、発情周期の把握、受胎維持の確認等がほぼ確実にできることがわかった。

<<考察>>

本研究では、人が摂取する全乳中に性ステロイドホルモンがどの程度含まれるのかという問いかけに対しても答えなければならない。用いた測定系の信頼度が影響するものと思われる。濃度推移のパターンについては、上述のように、牛の繁殖状況と一致するものであったが、濃度の信頼度については、下記の方法にしたがって検証を試みる必要があると思われる。

濃度決定に用いた検量線の傾きと全乳を段階希釈したサンプル中濃度の傾きが許容範囲の変動内にあること。生乳に既知の濃度のプロジェステロン／エストラジオール17 β 濃度を加えた際の、既知のプロジェステロン／エストラジオール17 β 濃度の回収率が許容範囲内で高いこと。これらを確認することによって、全乳中ステロイドホルモン濃度の測定のための方法としてTR-FIA法が適しているかどうかを確認することができる。

<<交差反応性（置換率50%として）>>

エストラジオール17βキット

物質	交差反応性
Ethinylestradiol	1.0
16-Oxoestradiol	0.9
Estrone	0.75
Estradiol-3-glucuronide, sodium salt	0.55
Estriol	0.4
Estradiol-3-sulphate, sodium salt	0.14
16-Hydroxyestrone	0.04
Estrone-3-sulphate	0.02
2-Hydroxyestradiol	0.02
Progesterone	<0.01
Testosterone	<0.01
Norgestrel	<0.01
17-α-Estradiol	<0.01
3, 17-β-Estradioldigulucuroconjugate	<0.01
Dehydroepiandrosteronesulphate	<0.001
Cortisol, Cortisone, Corticosterone	<0.001
Ethisterone, Mesterolone, Danazol	<0.001
Androstenedion	<0.001
Estrone-3-β-D-glucuroconjugate	<0.001

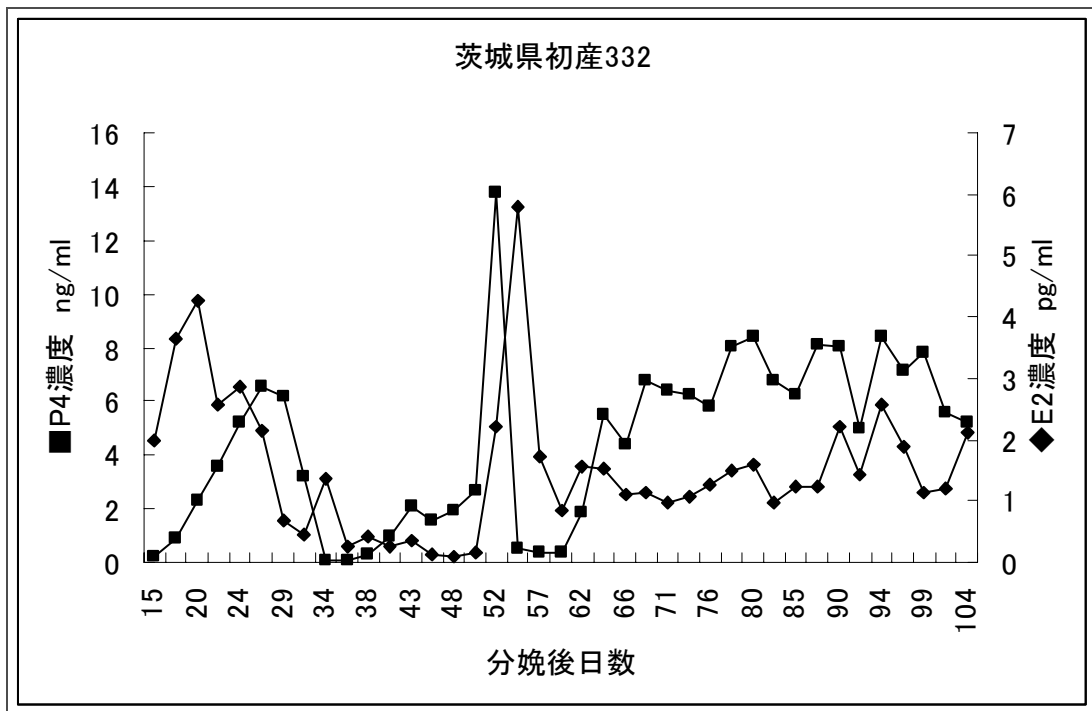
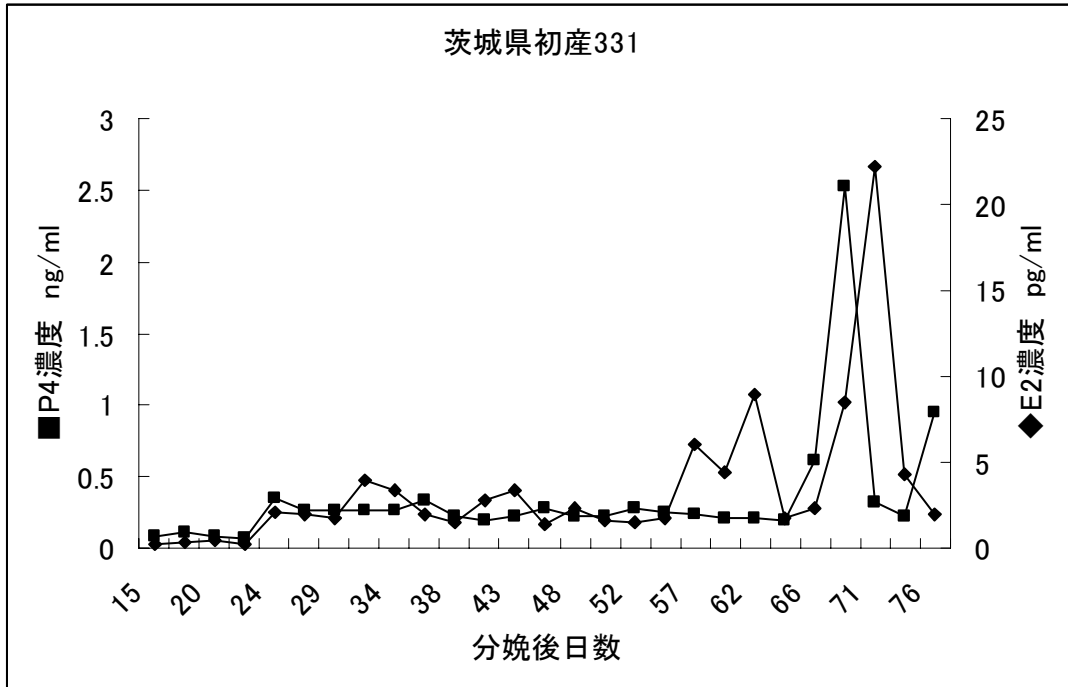
感度および測定内変動は、今後算出する予定である。測定間変動は、5.4%であった。

プロジェステロンキット

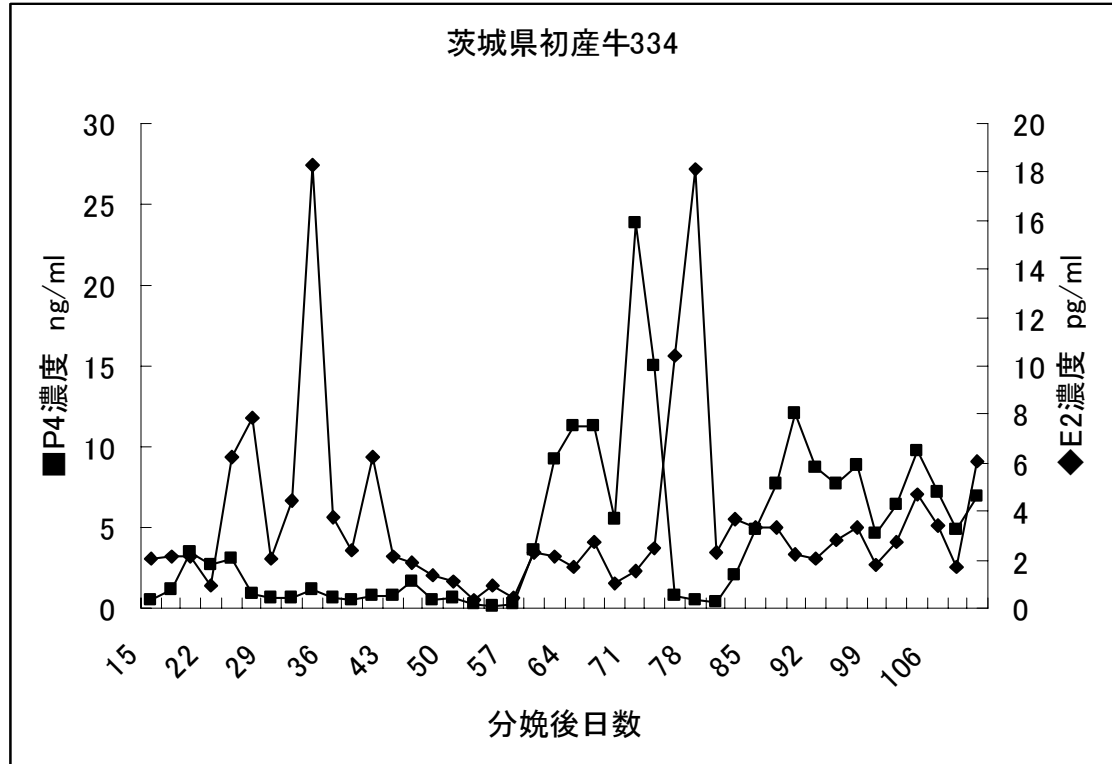
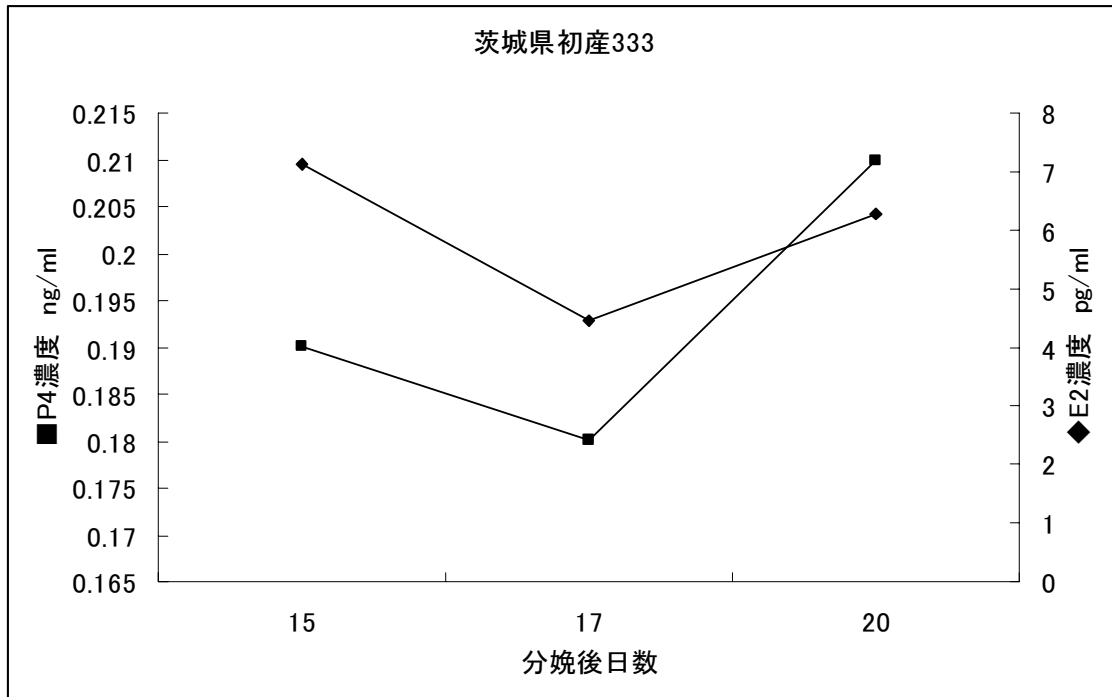
物質	交差反応性
5β-Dihydroprogesterone	45.0
5α-Dihydroprogesterone	6.5
Corticosterone	1.2
17α-Hydroxyprogesterone	0.63
Pregnanolone	0.4
20β-Dihydroprogesterone	0.14
Pregnenolone	0.11
11-Deoxycortisol	0.06
11-Deoxycorticosterone	0.05
20α-Dihydroprogesterone	0.05
Cortisol	0.01
Cortisone	0.01

感度および測定内変動は、今後算出する予定である。測定間変動は、7.6%であった。

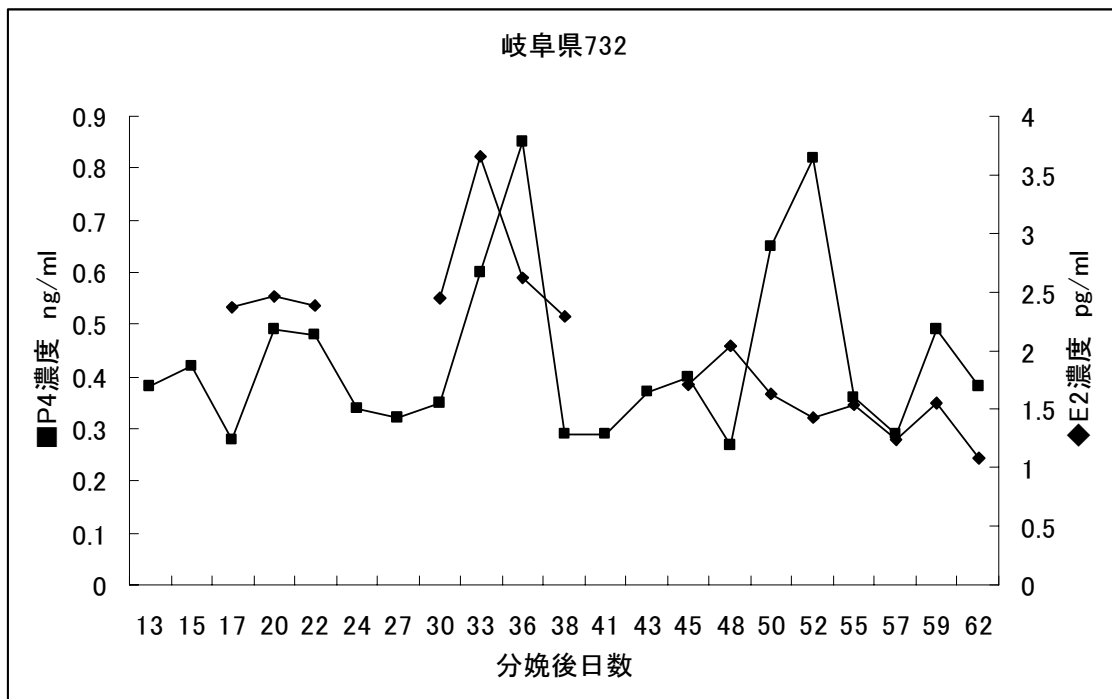
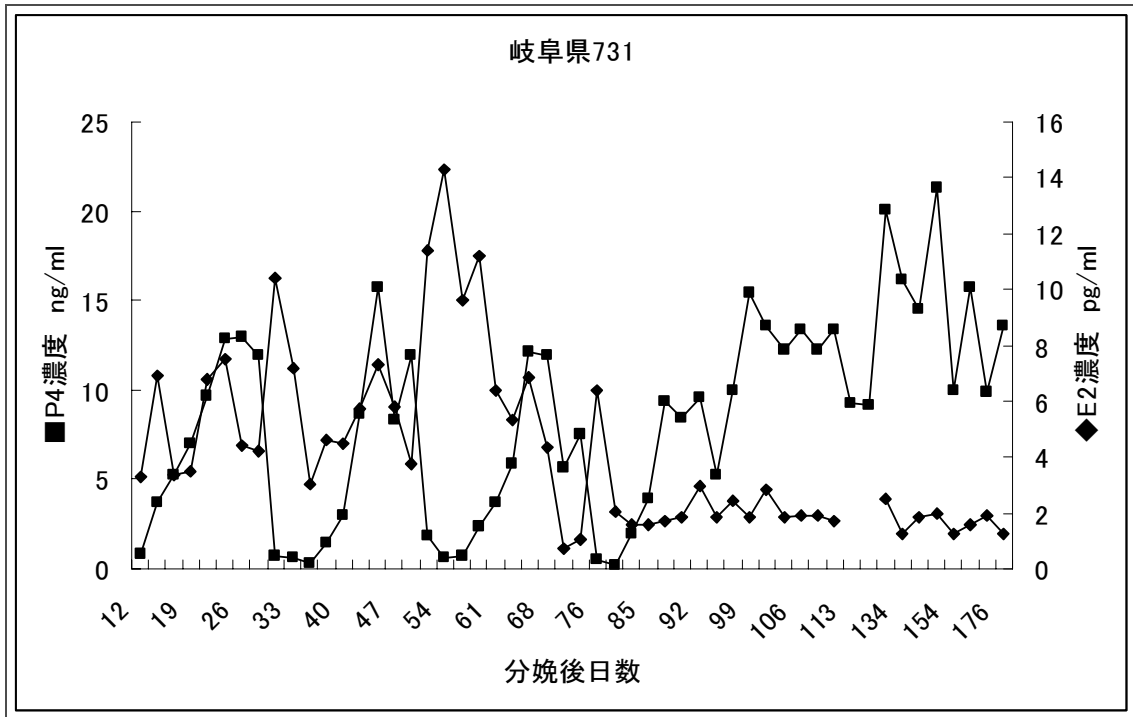
初産牛グループ（茨城、岐阜、宮城、熊本、福島、埼玉）



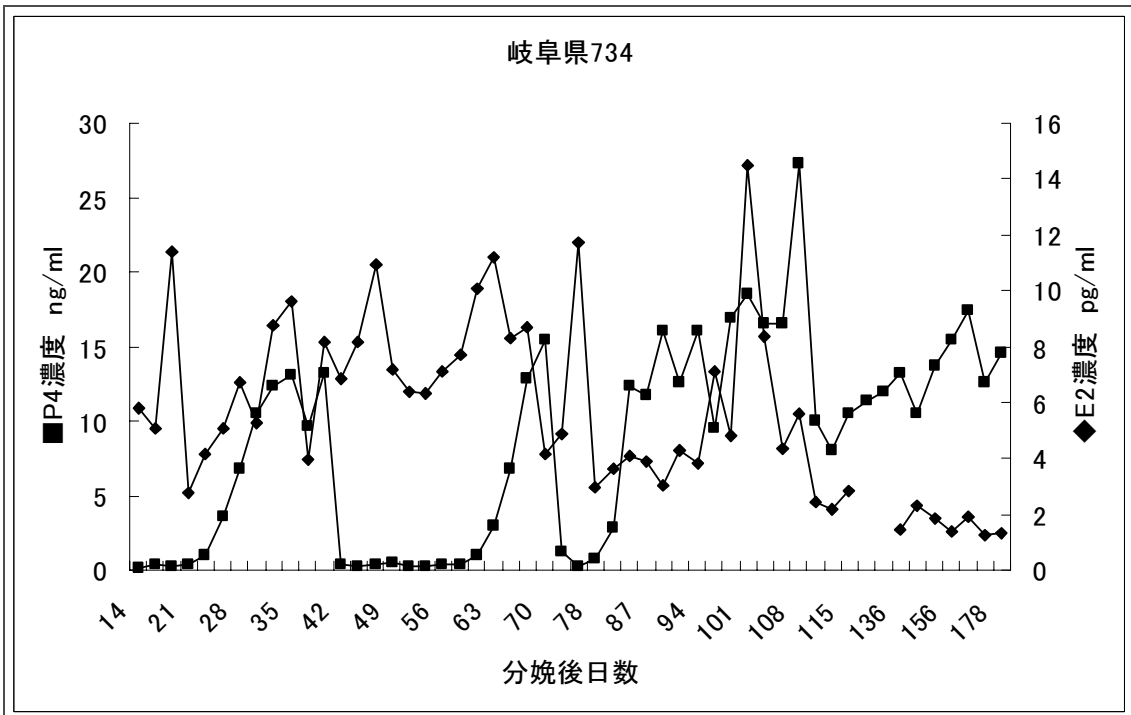
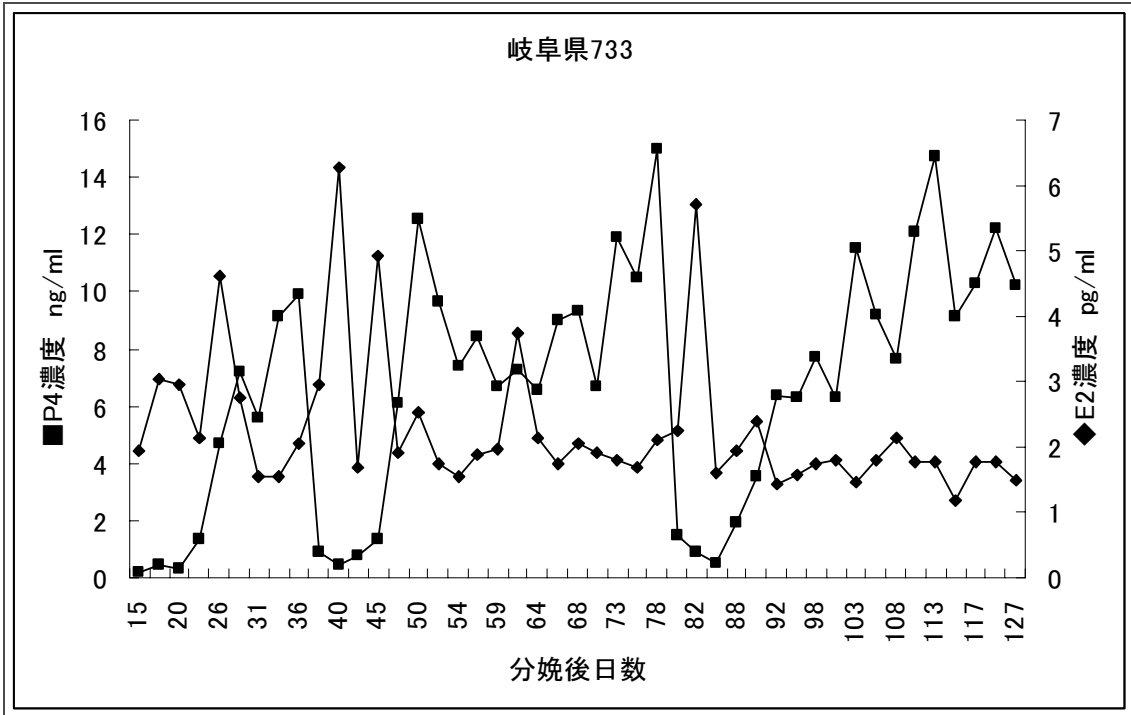
初産牛グループ（茨城、岐阜、宮城、熊本、福島、埼玉）



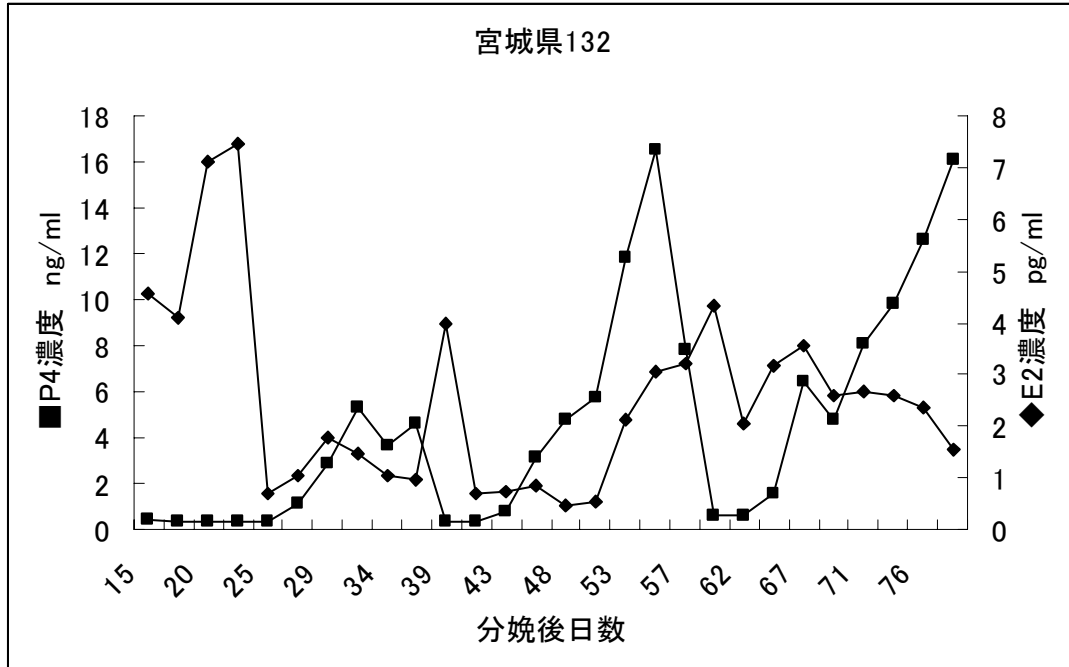
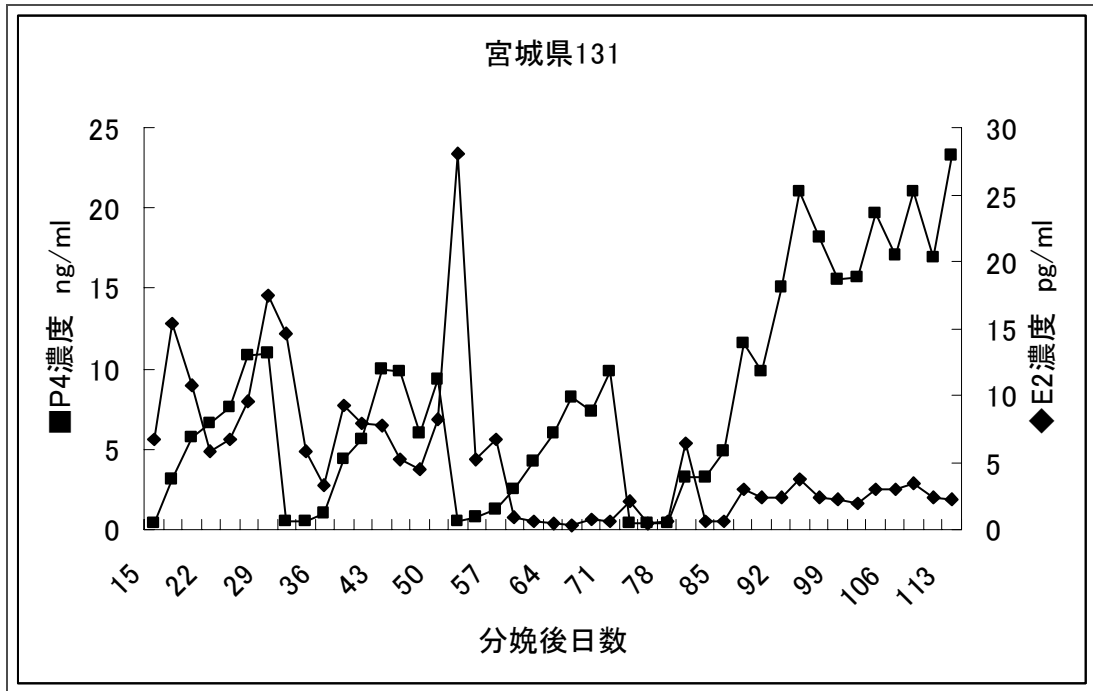
初産牛グループ（茨城、岐阜、宮城、熊本、福島、埼玉）



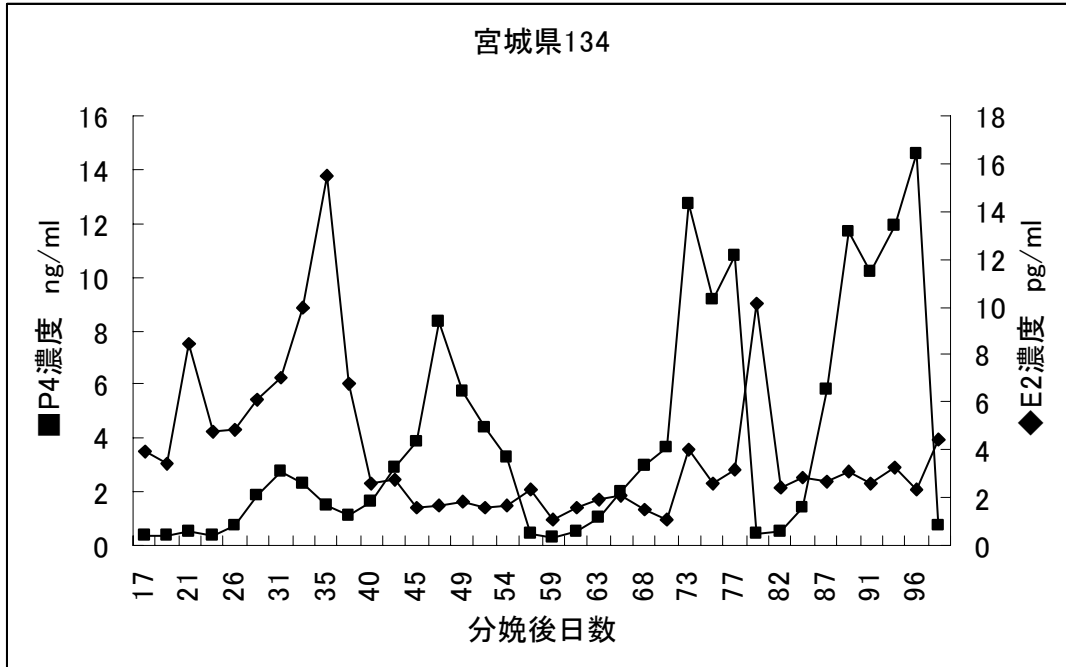
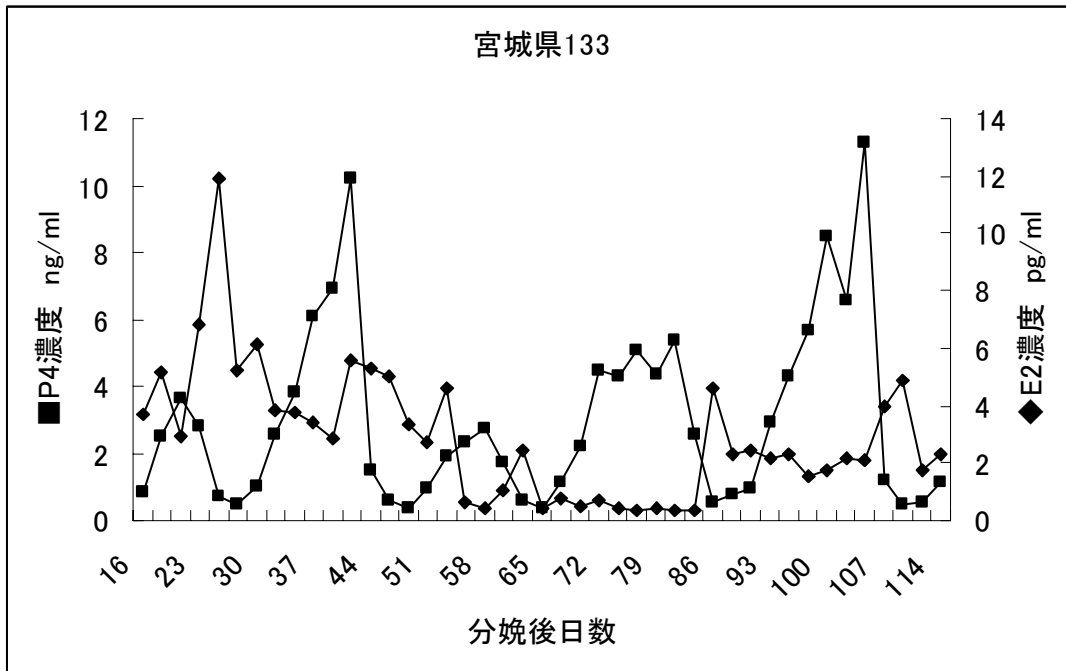
初産牛グループ（茨城、岐阜、宮城、熊本、福島、埼玉）



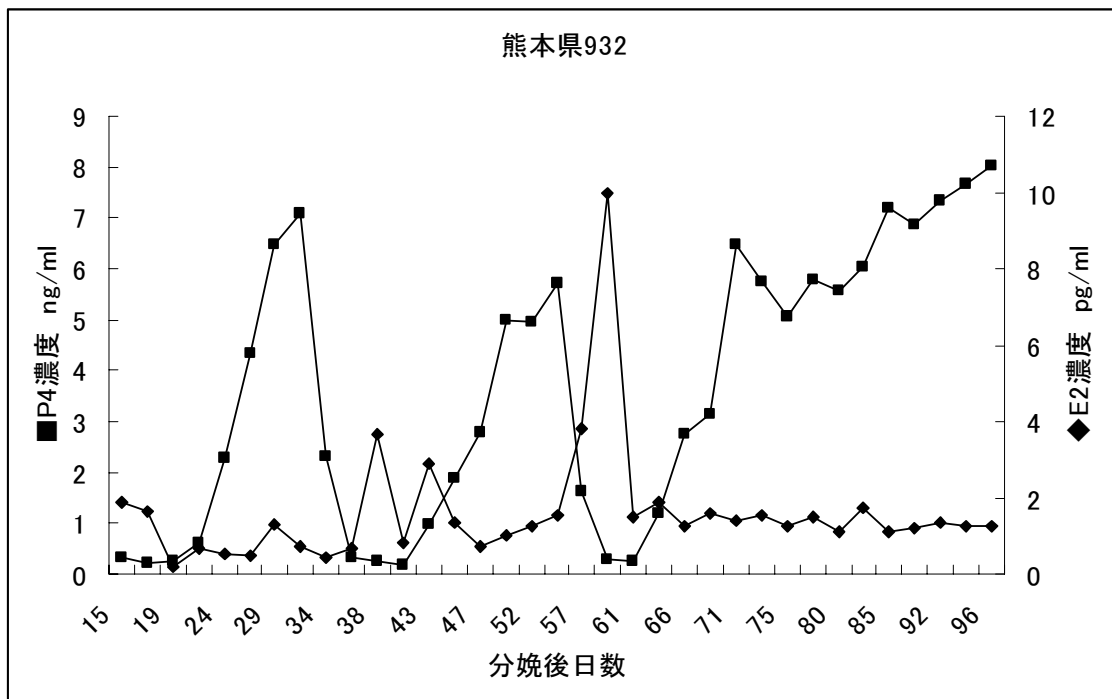
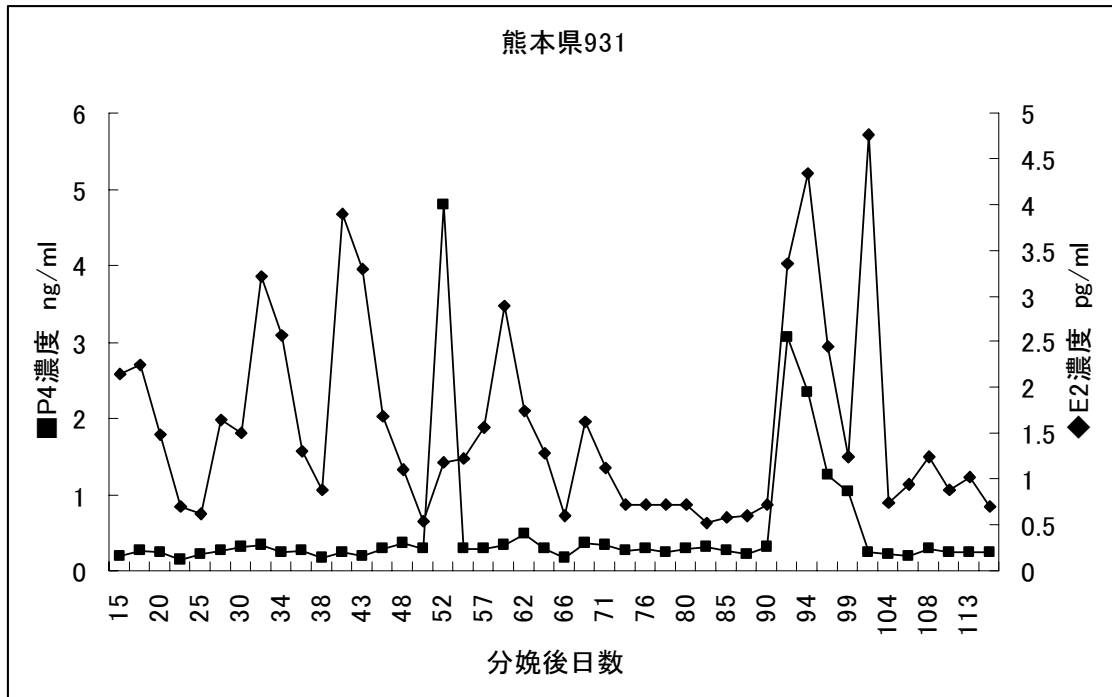
初産牛グループ（茨城、岐阜、宮城、熊本、福島、埼玉）



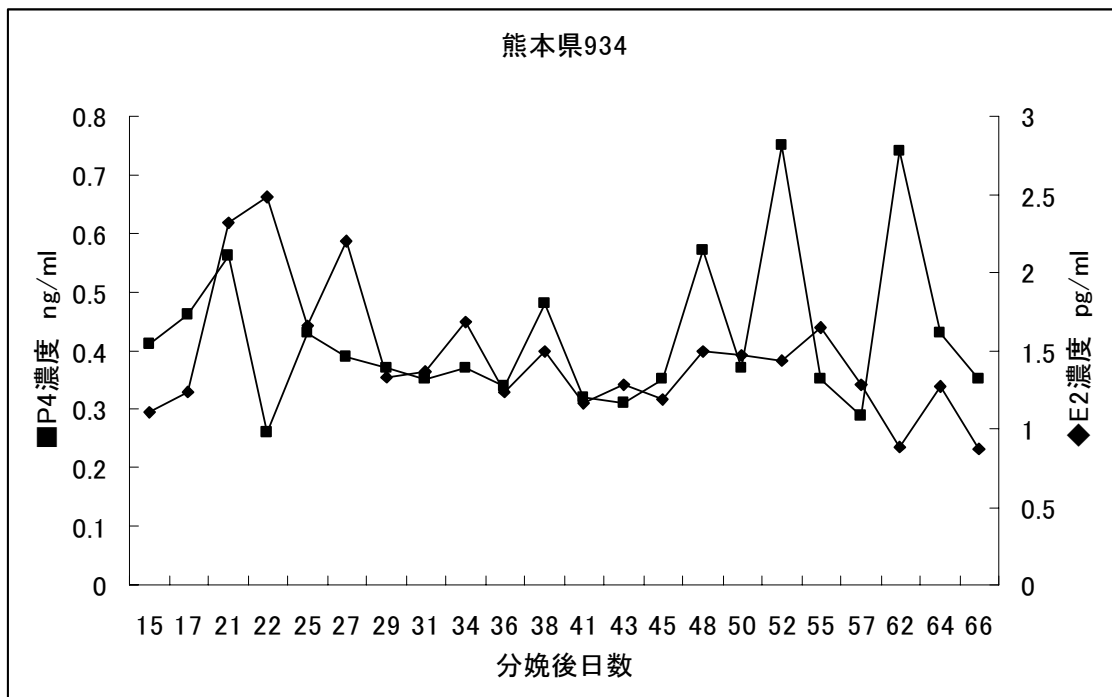
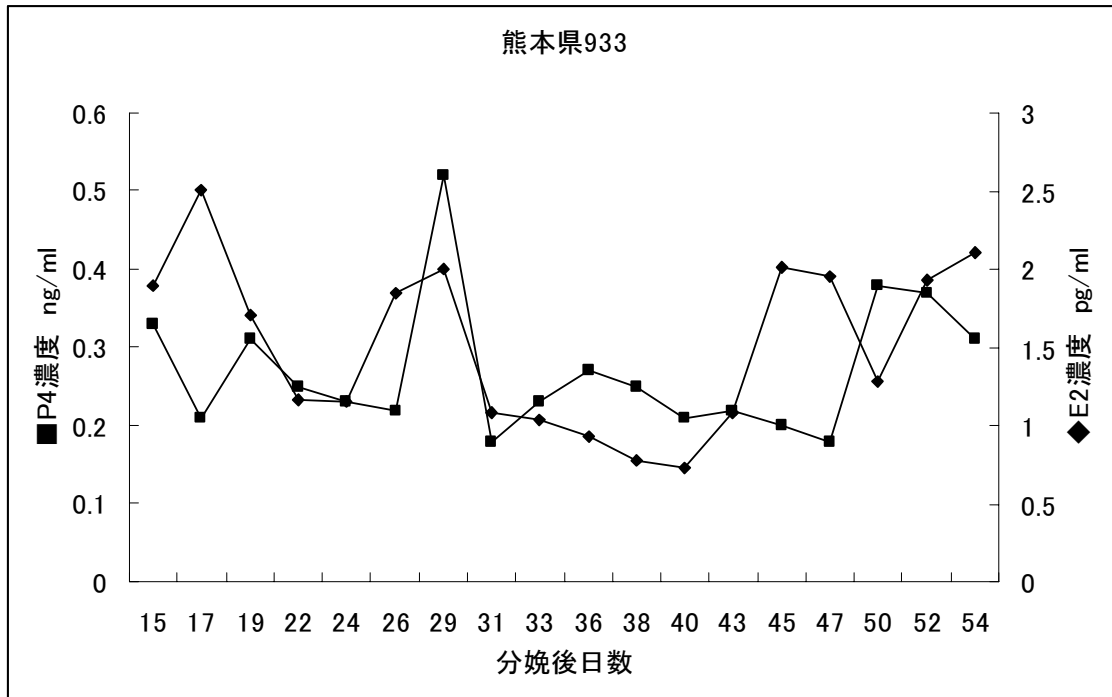
初産牛グループ（茨城、岐阜、宮城、熊本、福島、埼玉）



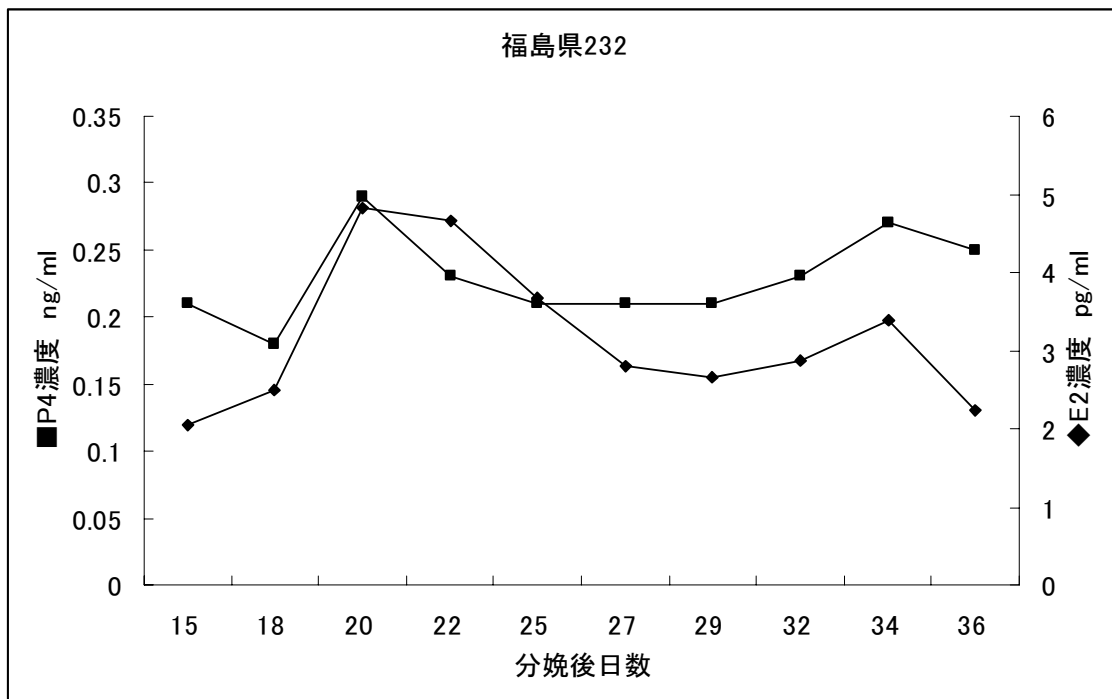
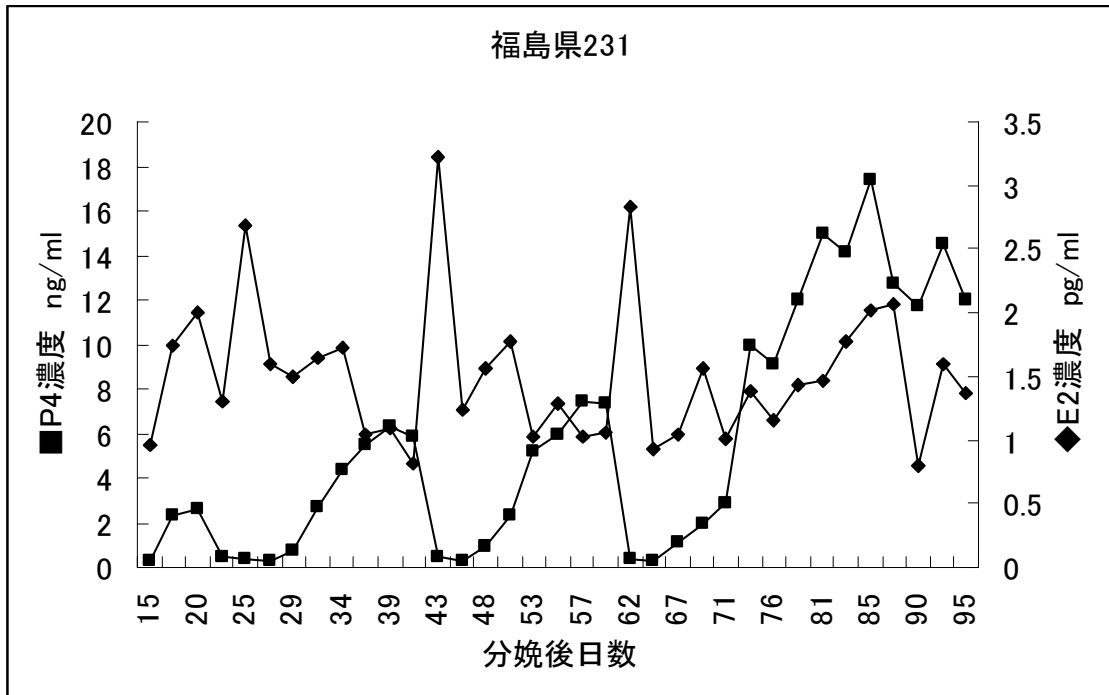
初産牛グループ（茨城、岐阜、宮城、熊本、福島、埼玉）



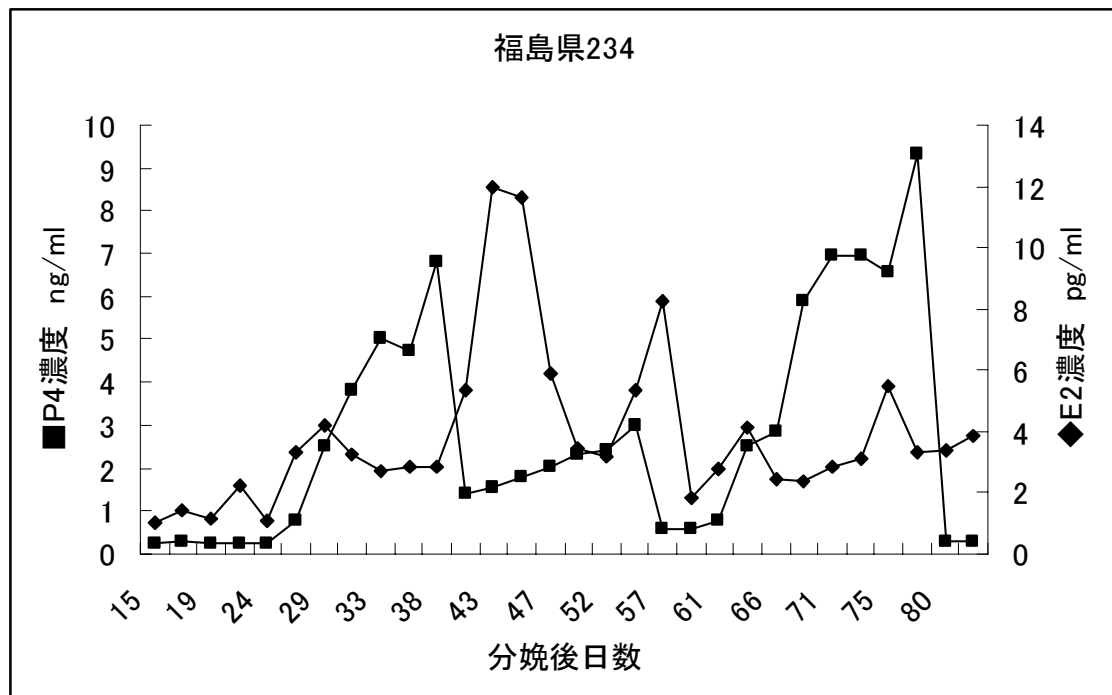
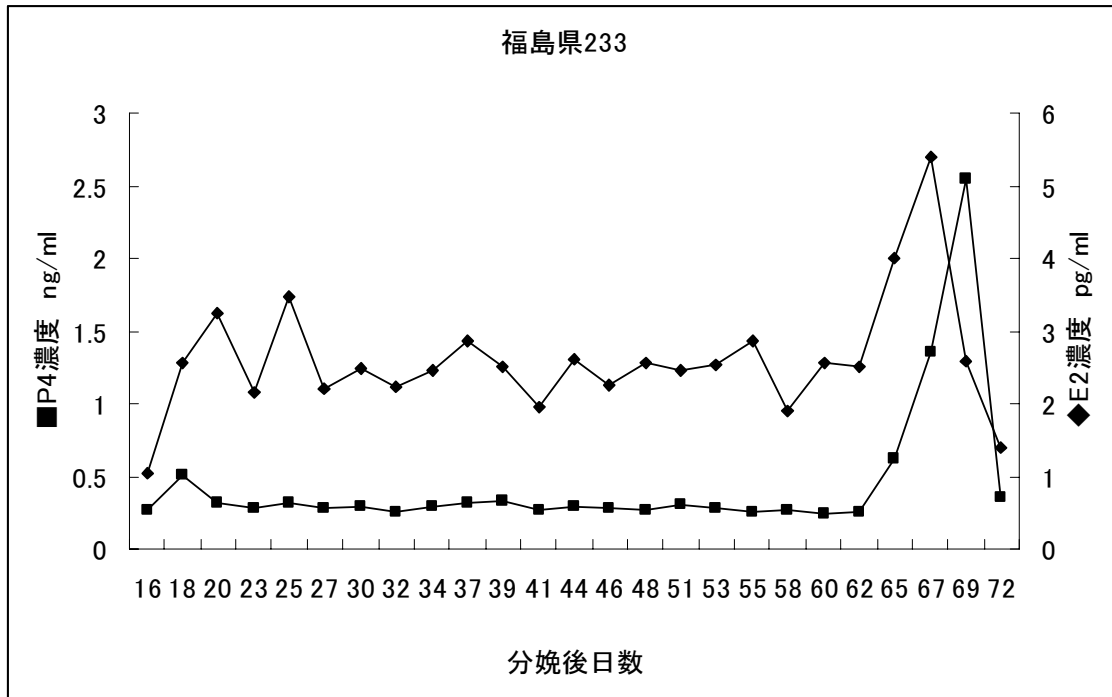
初産牛グループ（茨城、岐阜、宮城、熊本、福島、埼玉）



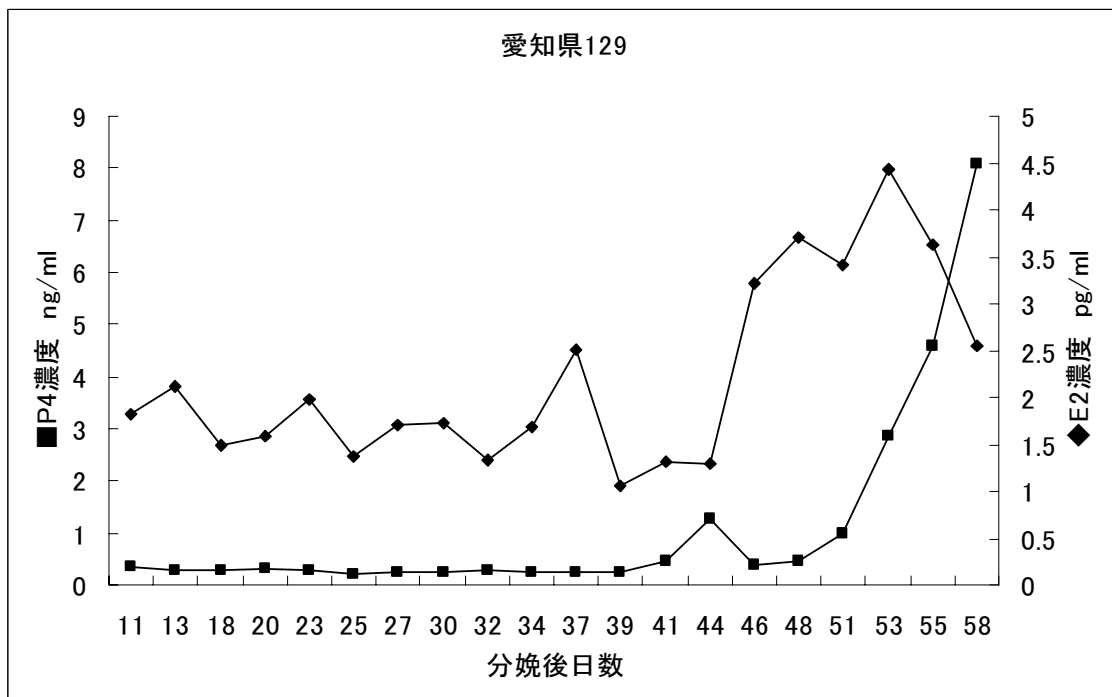
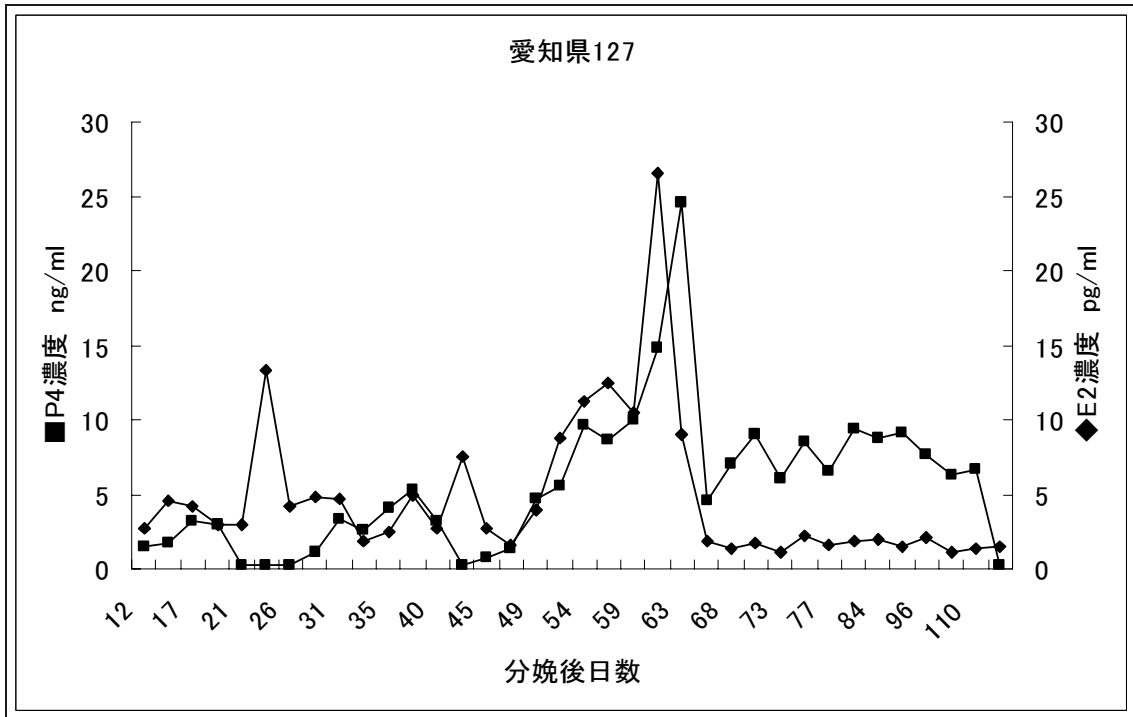
初産牛グループ（茨城、岐阜、宮城、熊本、福島、埼玉）



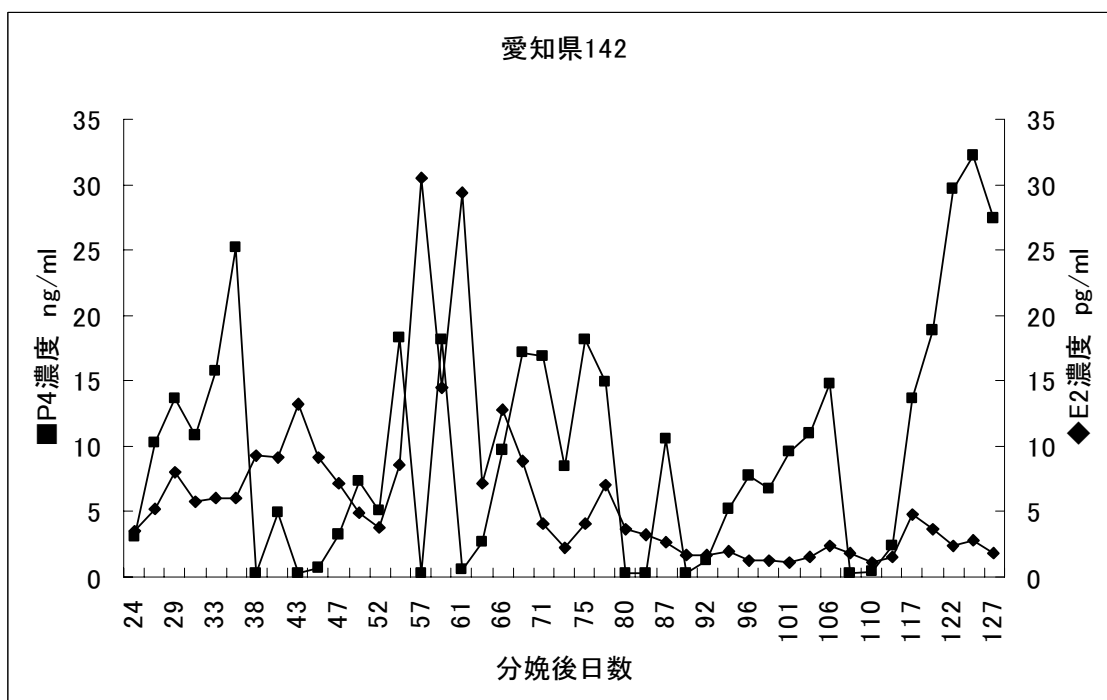
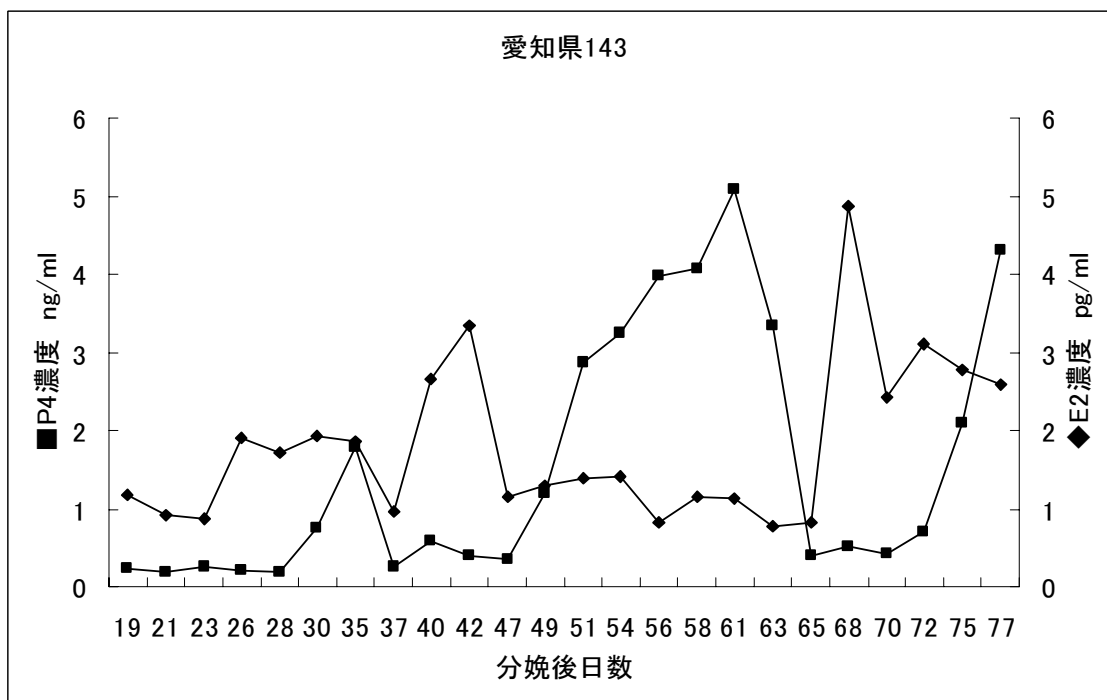
初産牛グループ（茨城、岐阜、宮城、熊本、福島、埼玉）



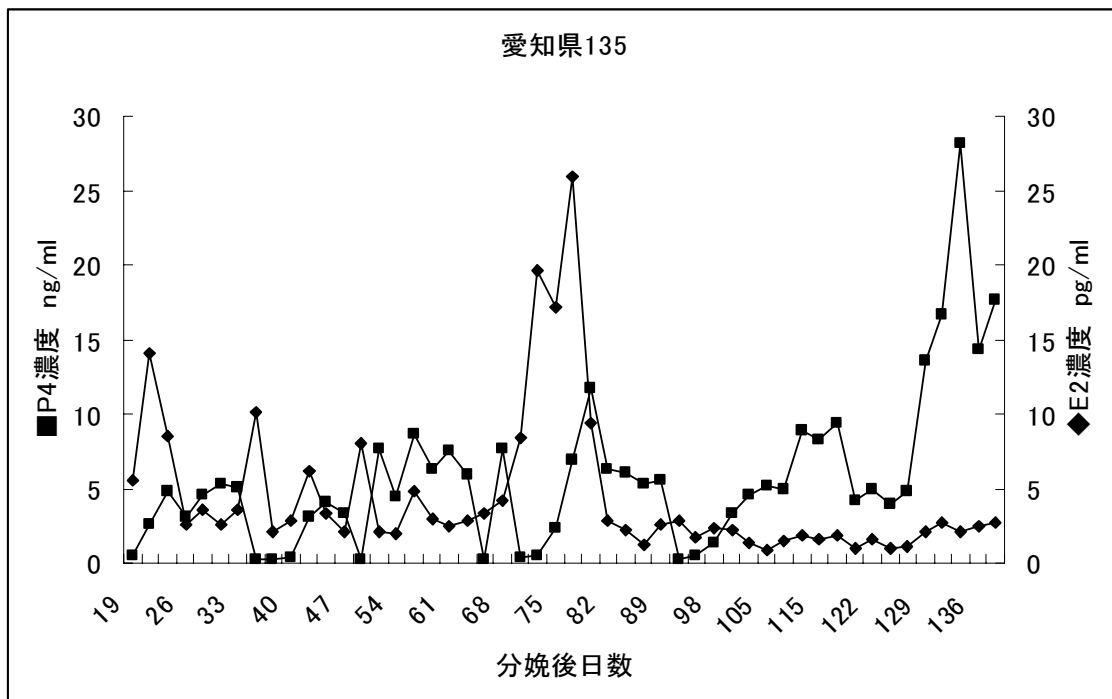
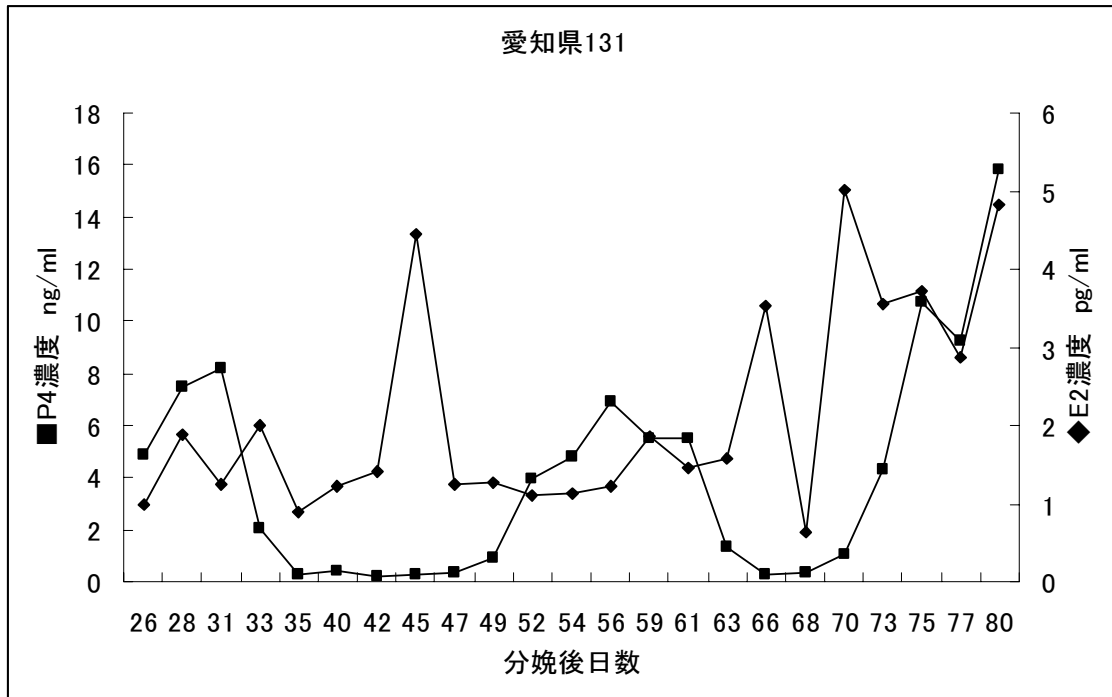
経産牛グループ（愛知、茨城、神奈川、石川、千葉、富山）



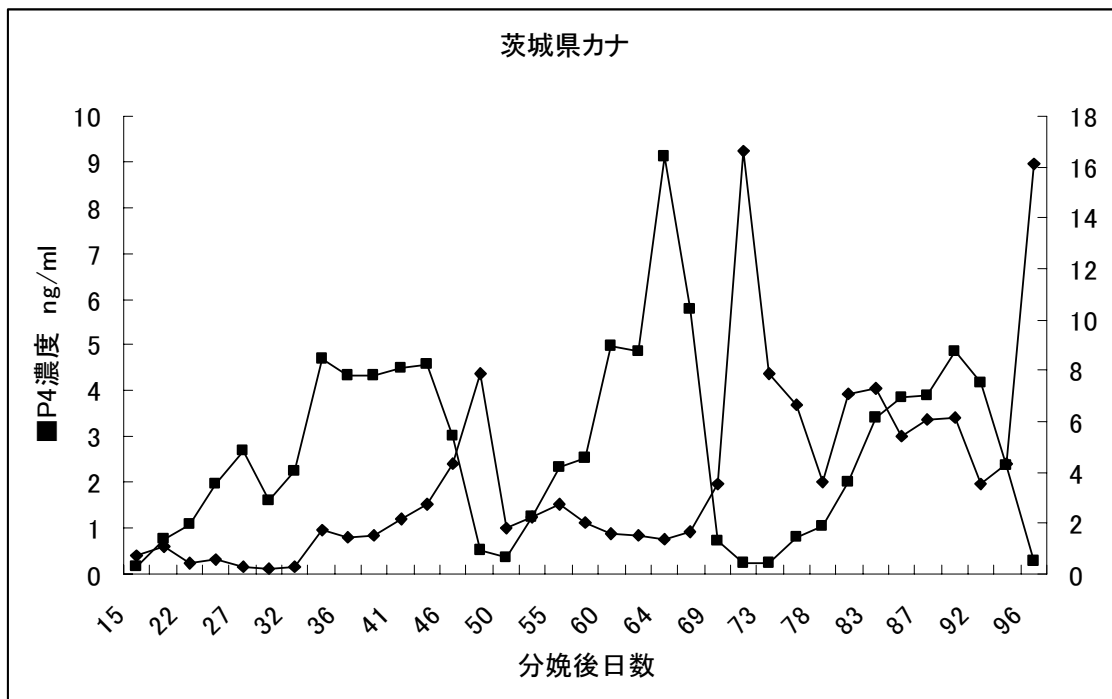
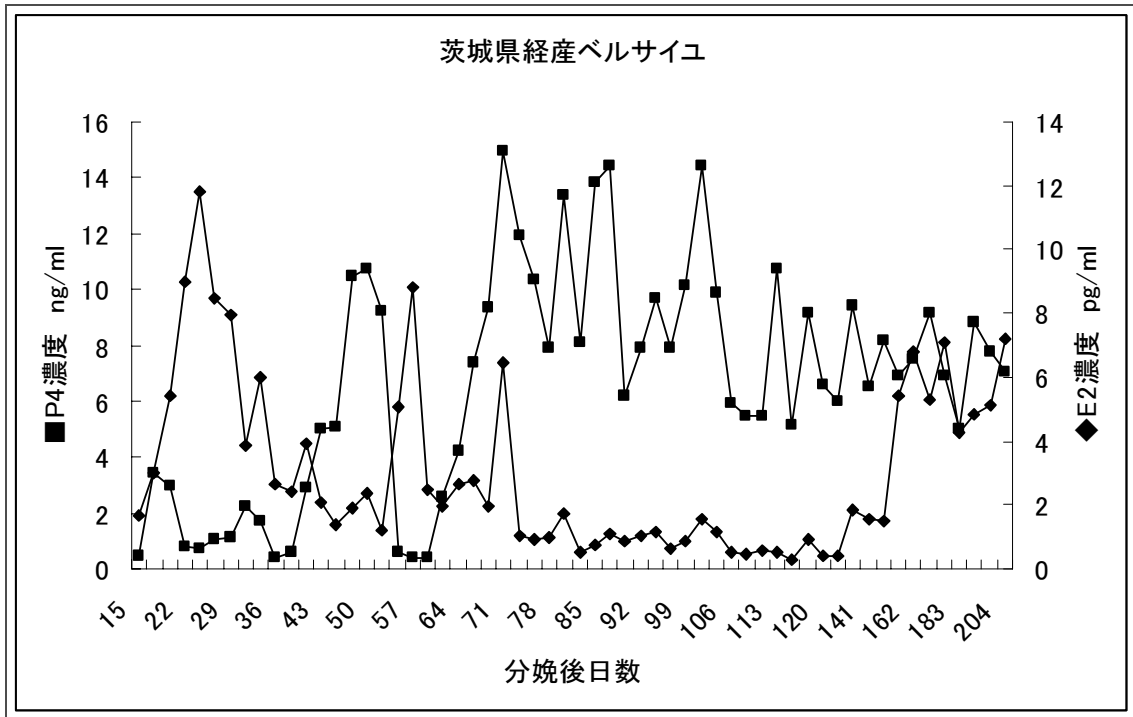
経産牛グループ（愛知、茨城、神奈川、石川、千葉、富山）



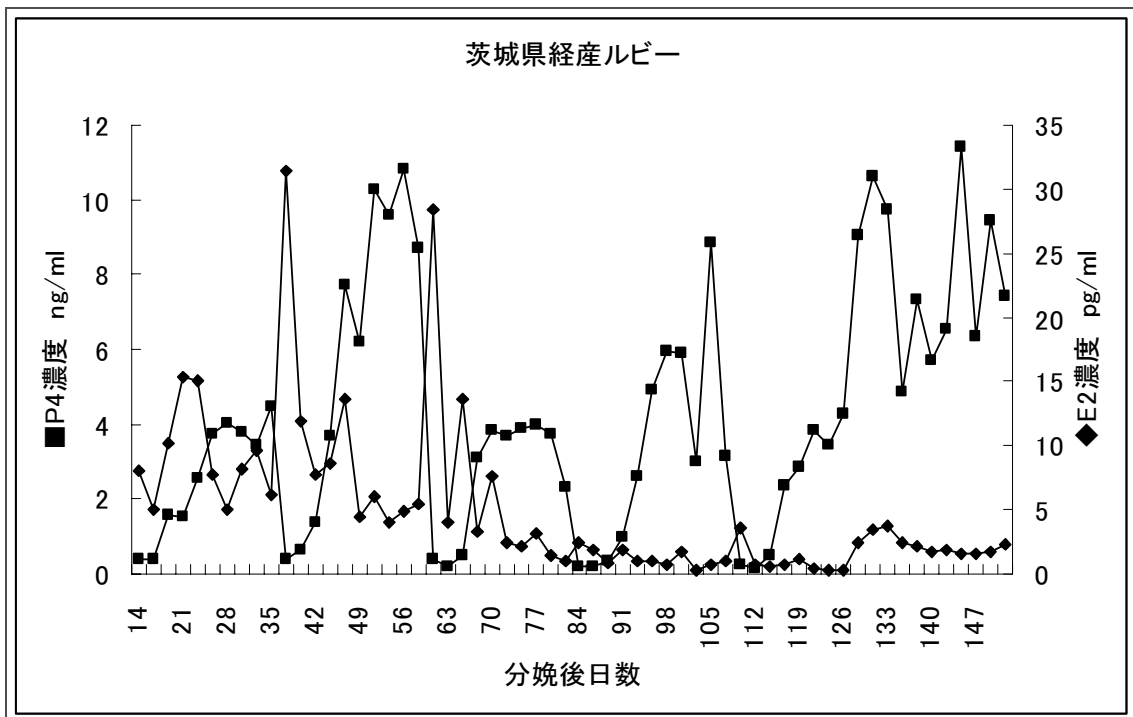
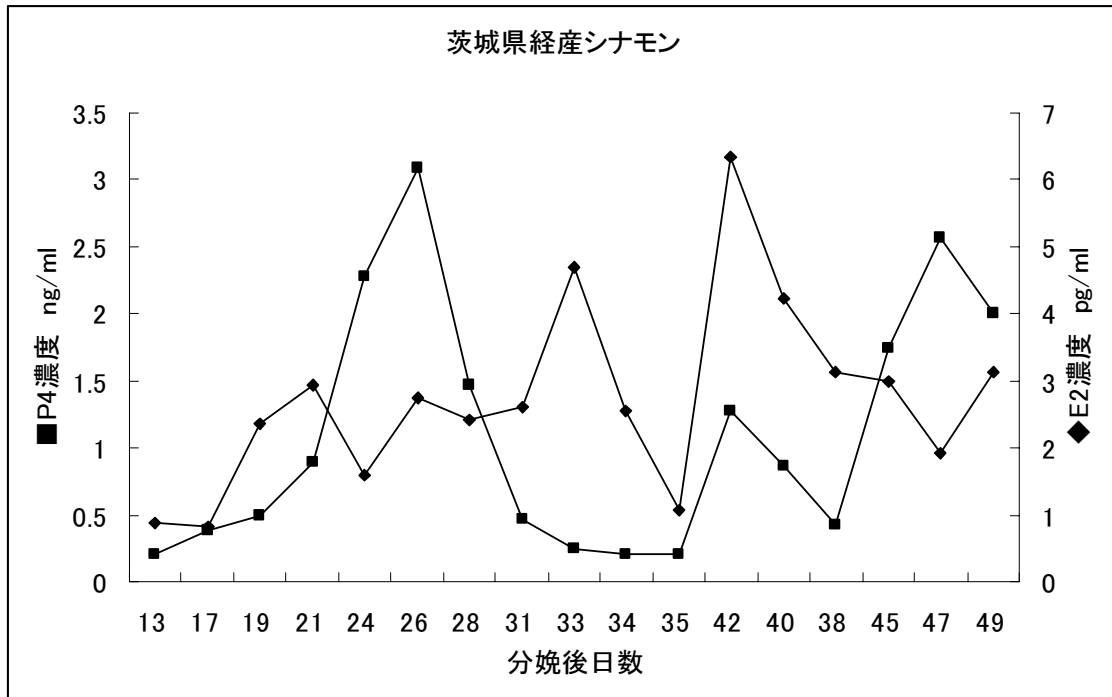
経産牛グループ（愛知、茨城、神奈川、石川、千葉、富山）



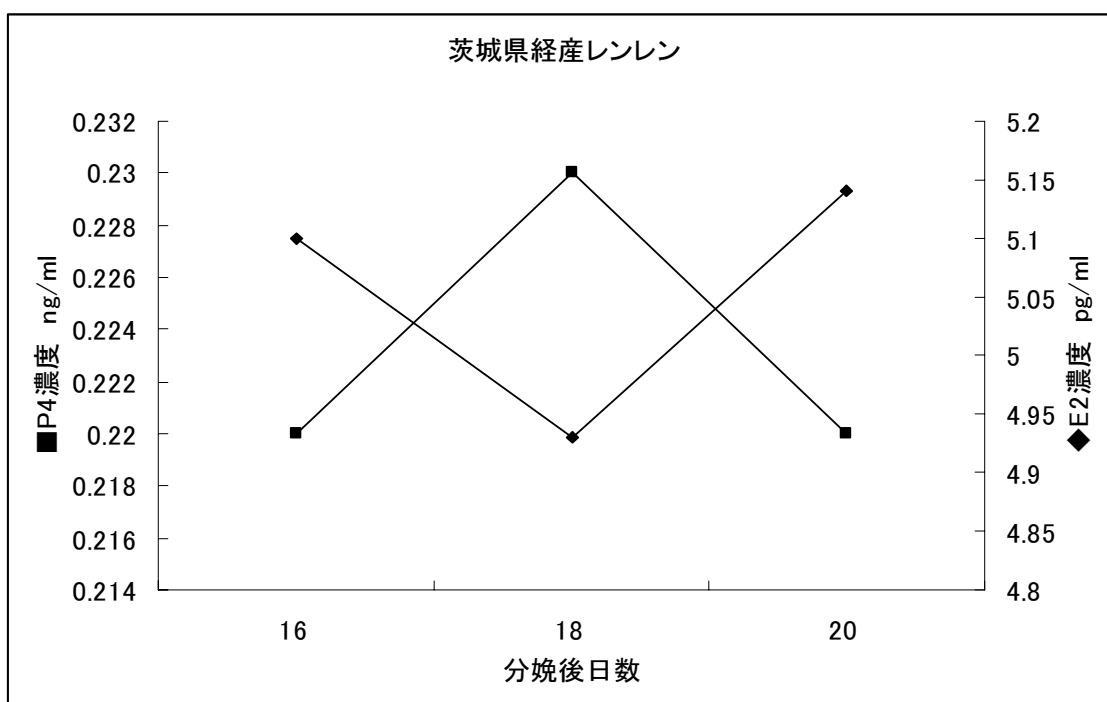
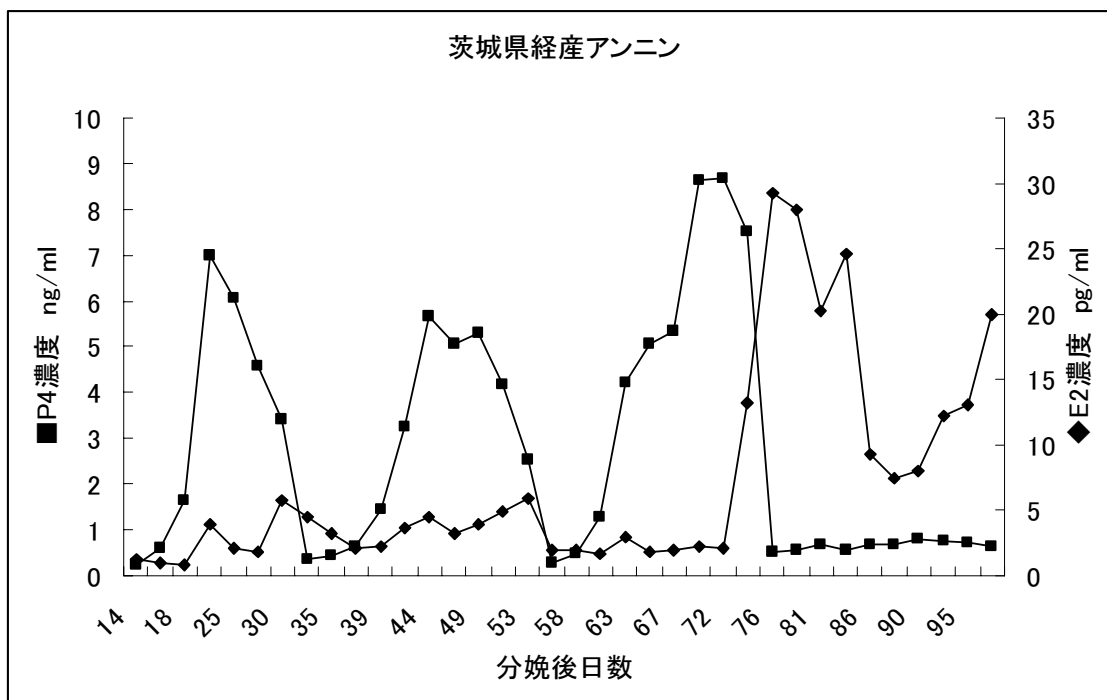
経産牛グループ（愛知、茨城、神奈川、石川、千葉、富山）



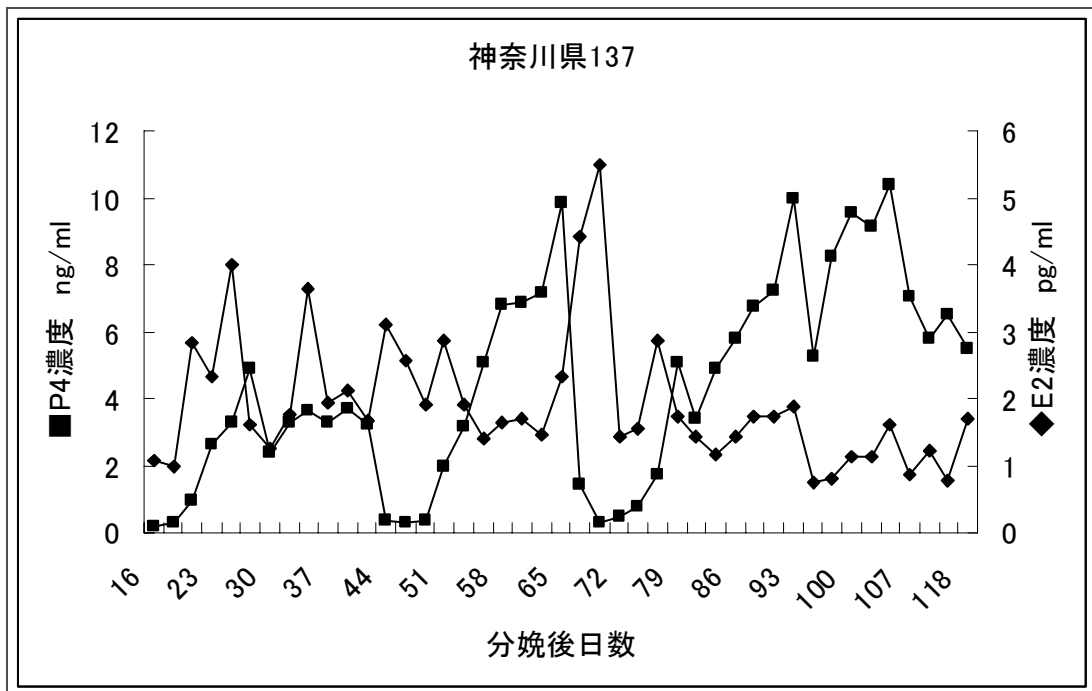
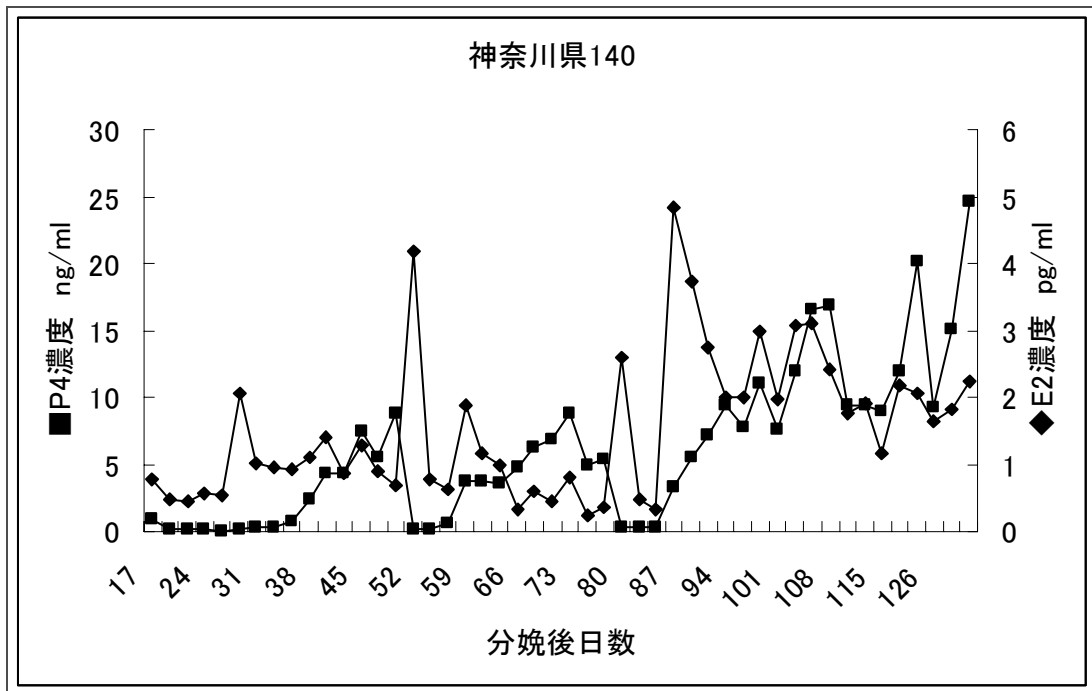
経産牛グループ（愛知、茨城、神奈川、石川、千葉、富山）



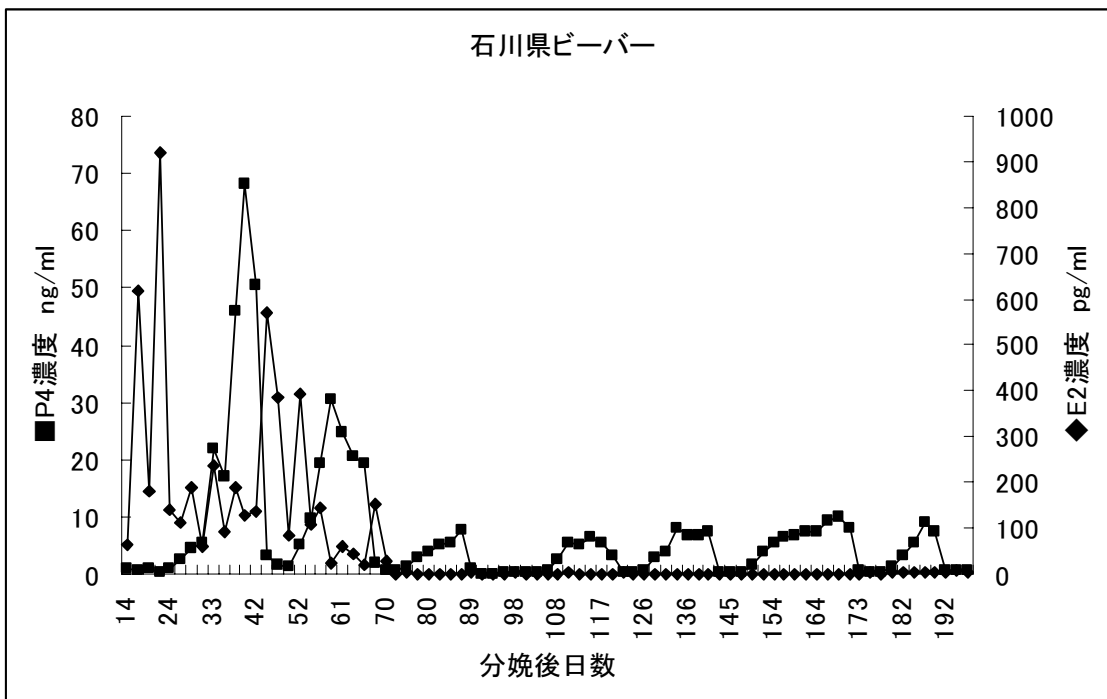
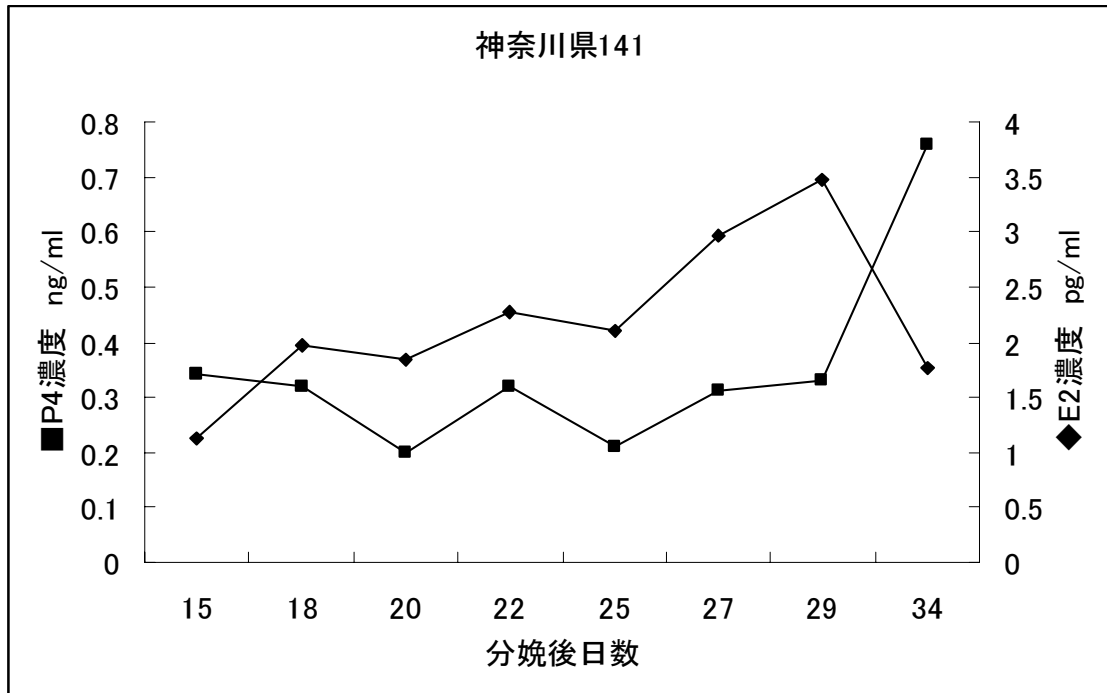
経産牛グループ（愛知、茨城、神奈川、石川、千葉、富山）



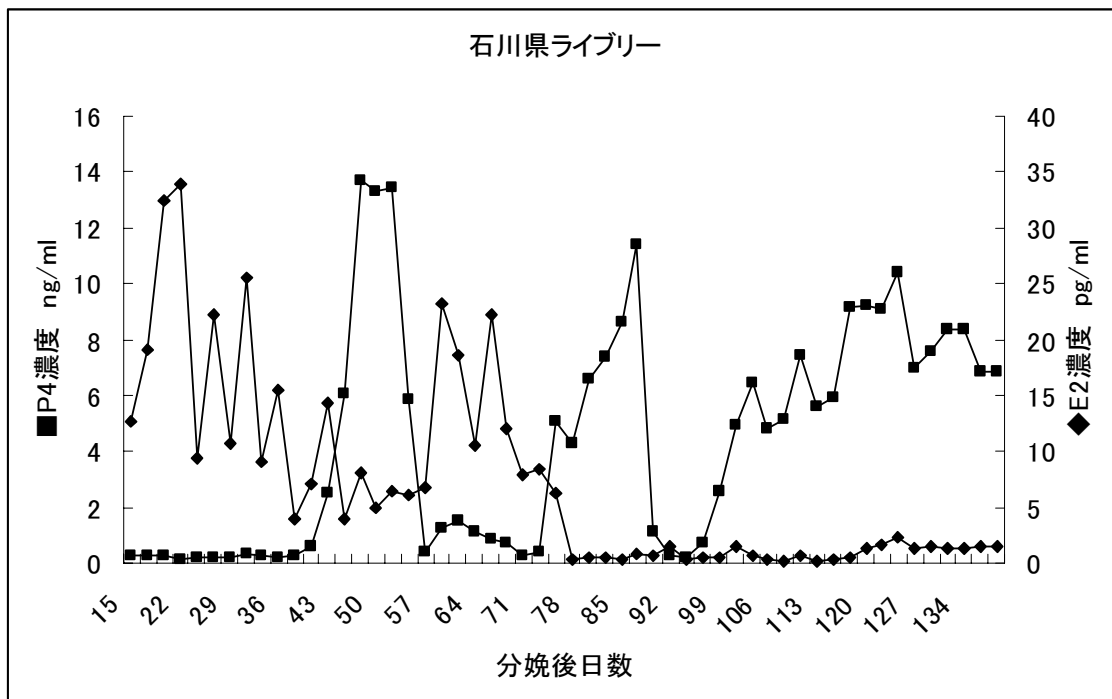
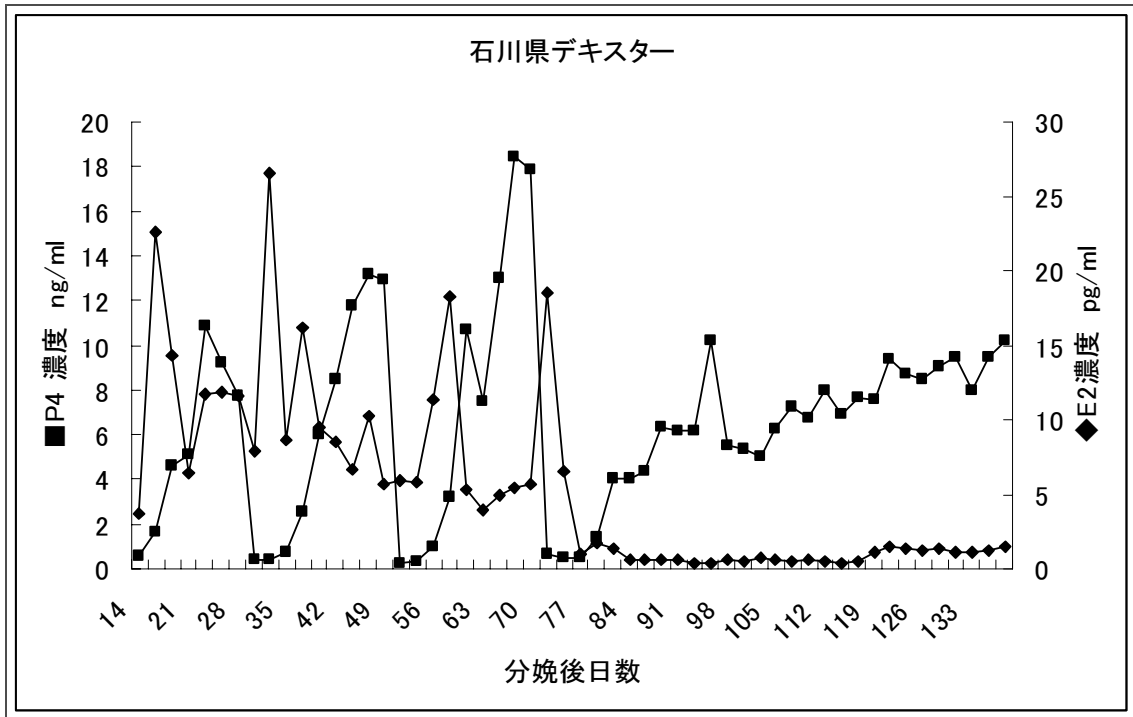
経産牛グループ（愛知、茨城、神奈川、石川、千葉、富山）



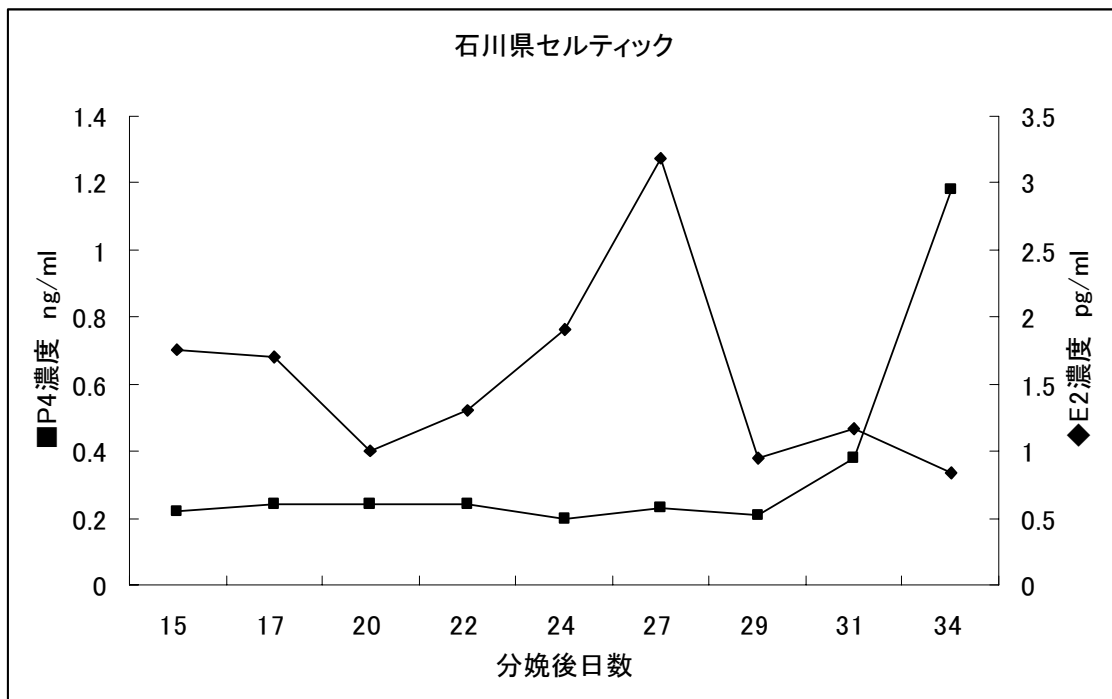
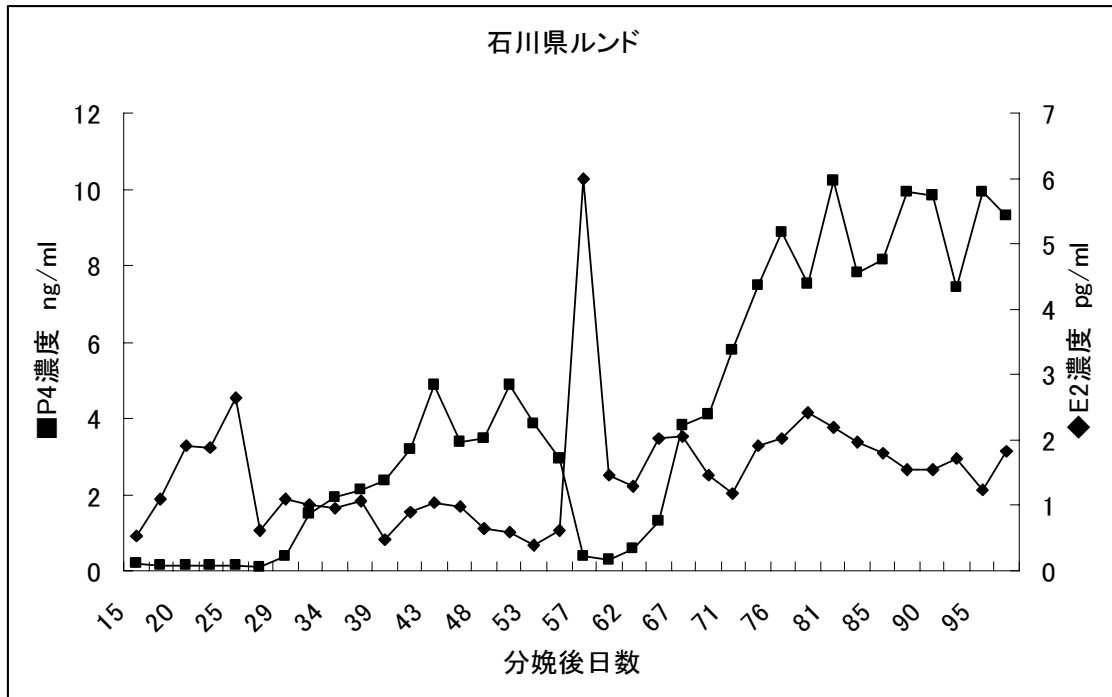
経産牛グループ（愛知、茨城、神奈川、石川、千葉、富山）



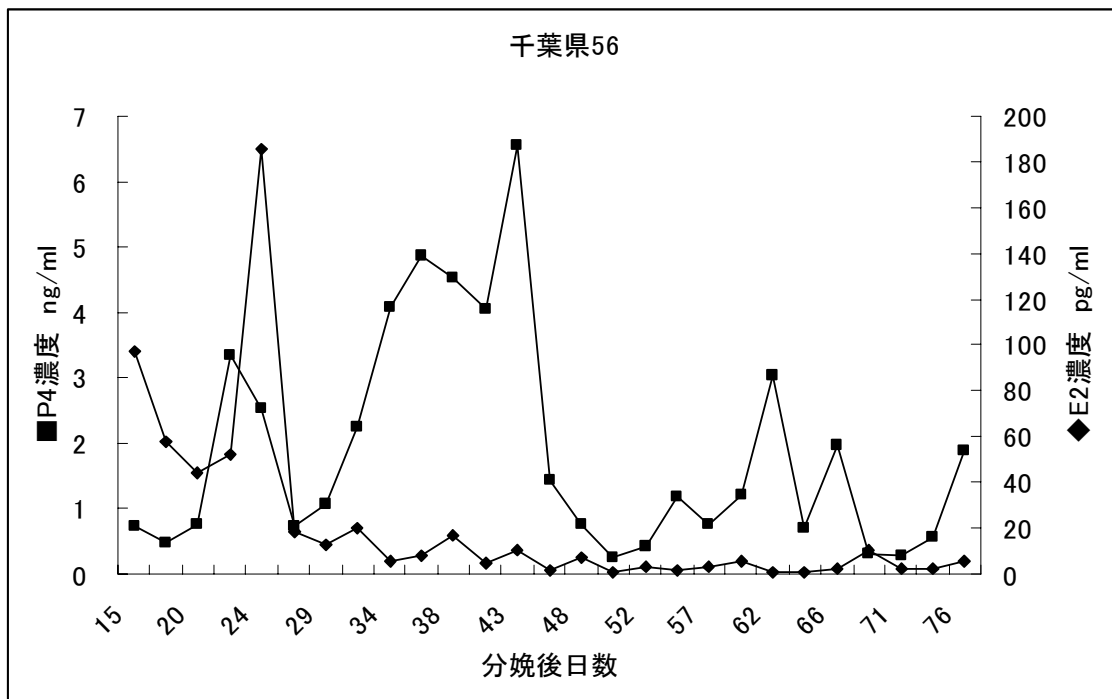
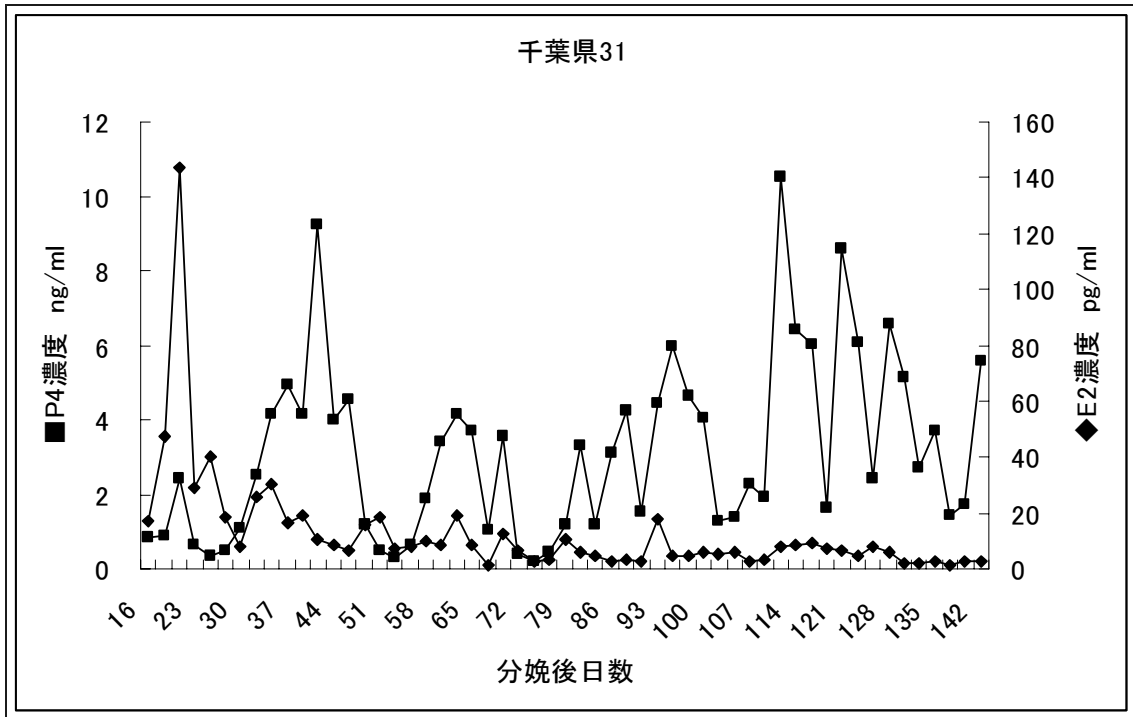
経産牛グループ（愛知、茨城、神奈川、石川、千葉、富山）



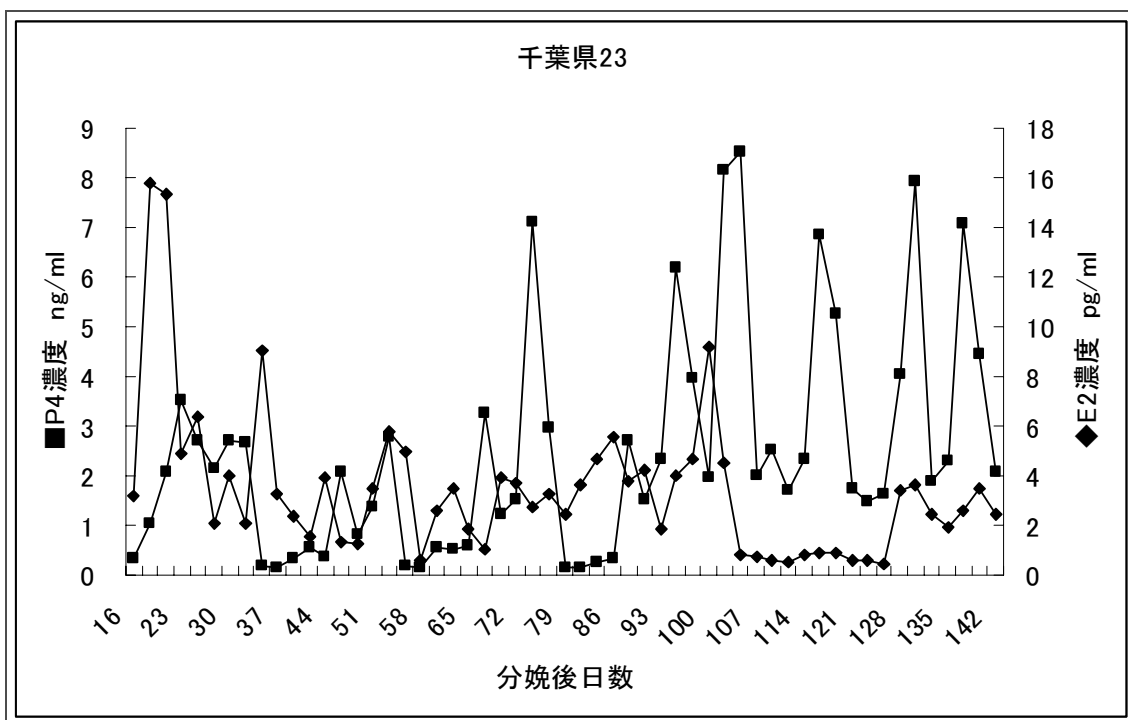
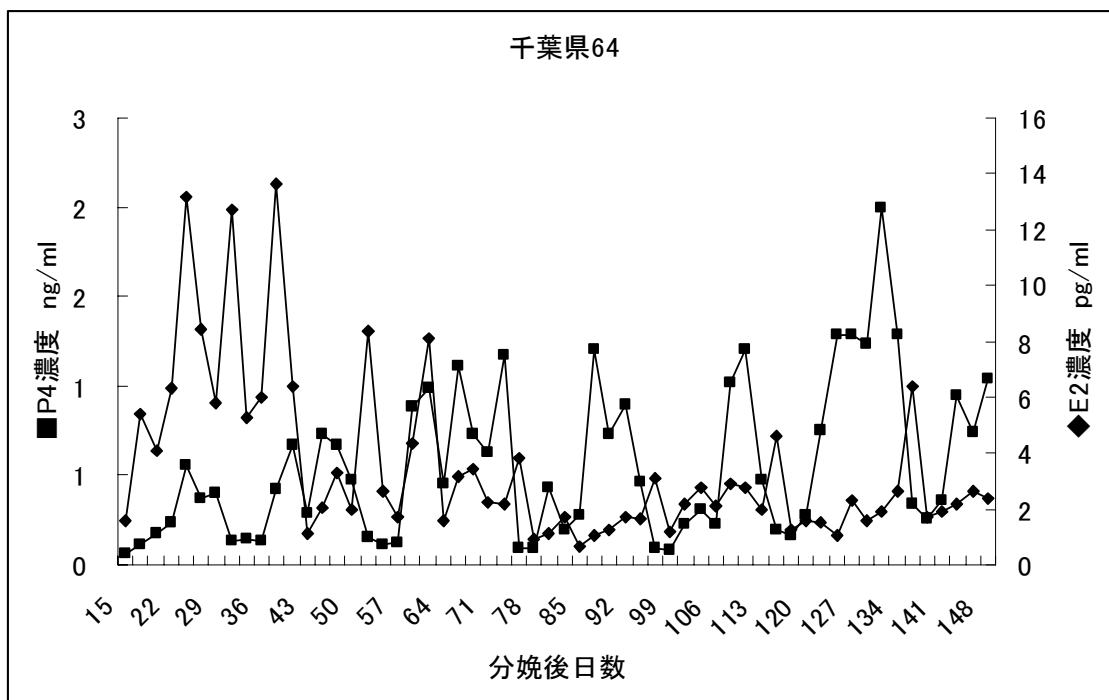
経産牛グループ（愛知、茨城、神奈川、石川、千葉、富山）



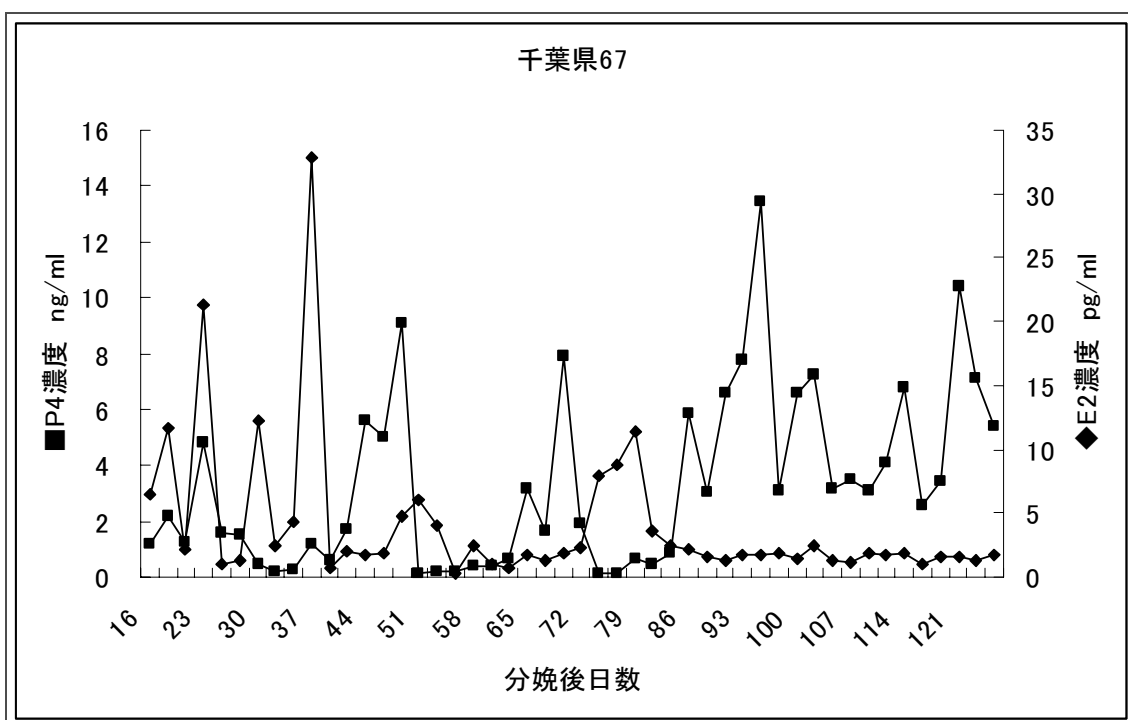
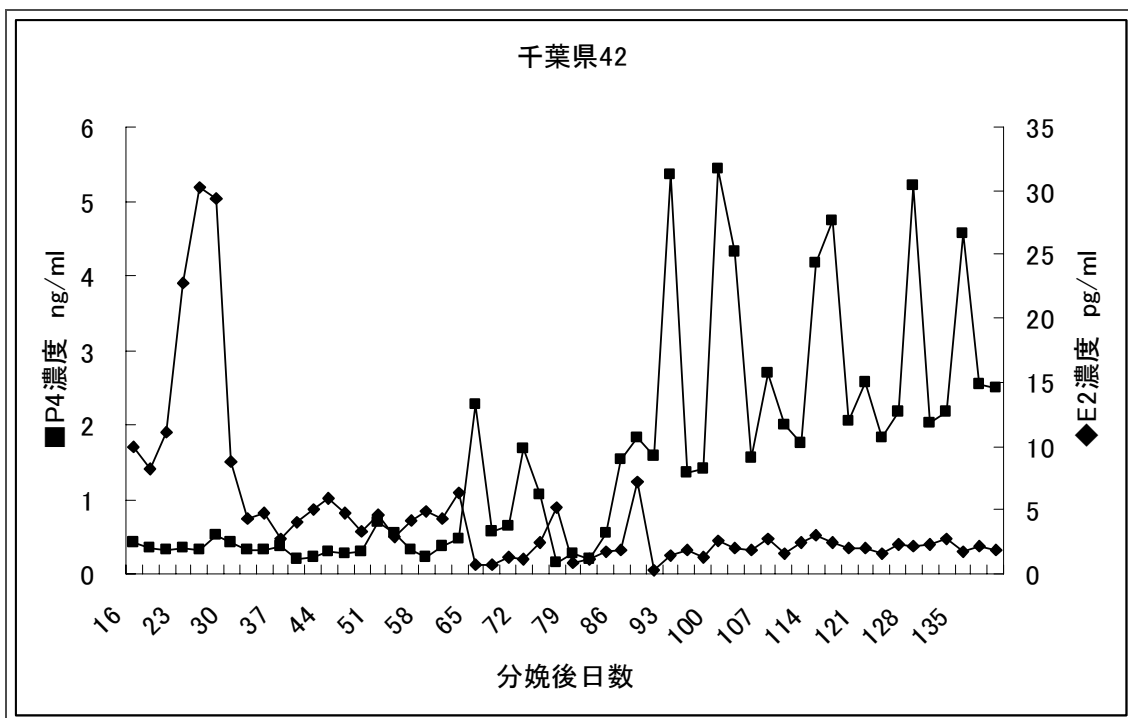
経産牛グループ（愛知、茨城、神奈川、石川、千葉、富山）



経産牛グループ（愛知、茨城、神奈川、石川、千葉、富山）



経産牛グループ（愛知、茨城、神奈川、石川、千葉、富山）



経産牛グループ（愛知、茨城、神奈川、石川、千葉、富山）

