

# 牛生乳中のステロイドホルモン動態に及ぼす 分娩後経過日数及び妊娠ステージの影響に関する研究

鹿児島大学農学部獣医学科 教授 小島 敏之

## <研究目的及び内容>

本研究では、酪農家での生乳の採材方法、生乳中の性ステロイドホルモン濃度測定のための処理および保存方法を検討するとともに生乳中の性ステロイドホルモン濃度の放射性同位元素を用いないアッセイ系の確立を目指した。また、併せて牛生乳中の性ステロイドホルモン動態に及ぼす分娩後経過日数および妊娠ステージの影響を調査することを目的とした。

従来から、搾乳牛に交配した後、比較的早い時期に受胎（妊娠成立）の可否を生乳中のプロジェステロン濃度の高低によって診断する方法が開発・応用されていたことから、生乳中に性ステロイドホルモンが含まれていることは獣医畜産の現場では自明のことであった。しかし、今回改めて本研究助成金を受けて生乳中のステロイドホルモンの出現状況を調査することについては、診療応用を目的とした性ステロイドホルモンの濃度測定は別として、実際に搾乳牛（農家によっては搾乳牛全頭）から生乳を採材して生乳中の性ステロイドホルモン動態を調査する大規模なものではなかったと記憶する。今回の調査によって、その動態が明らかになることが期待される。

## <研究の方法>

本研究遂行のために生乳を採材した農家・牧場は、鹿児島県内3軒、宮崎県小林市内1軒、福島県西白河郡内1軒、岩手県盛岡市内1軒、北海道日高郡内1軒の計7軒であった。鹿児島県内および宮崎県内の農家・牧場については、2～4回反復して採材を行った。採材農家・牧場の情報は、表1の通りであった。その他、市販の牛乳についても商店で購入したものを少数例（2例）ながら採材して、性ステロイドホルモン濃度の測定に供した。

## <<生乳の採材方法>>

本研究では、調査対象農家・牧場の搾乳中のほぼ全頭から生乳を採材する必要があることから、調査の主旨を理解していただくことが必要であった。その代わりに、測定した個々の牛のプロジェステロン濃度を農家にフィードバックして繁殖管理に役立てていただく配慮を行った。特に、最初の妊娠診断で受胎と診断された牛のプロジェステロン濃度が低値であったため、再診の結果、空胎（早期胚死滅あるいは流産したと推定される）であることが判明した例があった。あるいは、分娩後の生理的空胎期間を超えても交配ができない牛では生乳中のプロジェステロン濃度とエストラジオール17β濃度が両者とも低値であったことから具体的な治療方針を立てるのに役立つという例も存在した。

生乳採材のタイミングが農家・牧場によって微妙に異なっていた（表1）。日常作業のなかで前搾り乳をサンプルとした農家（鹿児島U牧場）、牛群検定日に合わせて混合乳を採材した農家（鹿児島A牧場、霧島牧場、福島牧場、新冠牧場）、牛群検定日と重ならないように混合乳を採材した農家（岩手牧場、宮崎牧場）の3通りであった。搾乳ロボットが導入されている宮崎牧場

では自動サンプリング装置により1頭当たり約25mlを採材したが、他は概ね平均40ml以上の採材量であった。サンプル採取後直ちに、冷蔵して研究室に持ち帰るか（再短で2時間）、あるいは遠隔地の場合は冷蔵宅配便を利用して搬送した。最長では、以下に述べる処理に入るまでに96時間を要したが、アジ化ナトリウムなどの保存剤は一切使用しなかった。

表1

牧場名(採材時期)	生乳採材年月日	採材頭数	飼養形態
鹿児島A牧場 (夕方搾乳時)	2008/8/27	29	フリーストール
	2008/9/16	70	
	2008/10/20	67	
	2008/11/18	71	
鹿児島U牧場 (夕方搾乳時)	2008/7/18	26	つなぎ飼い
	2008/9/26	35	
	2008/10/27	45	
	2008/11/26	30	
霧島牧場 (早朝搾乳時)	2008/11/4	83	フリーストール
	2009/1/10	100	
宮崎牧場 (午前中)	2008/9/29	20	フリーストール (ロボット搾乳)
	2008/10/27	20	
	2008/12/15	20	
	2009/2/13	20	
岩手牧場(夕方)	2009/1/23	85	フリーストール
福島牧場(夕方)	2009/2/3	24	フリーストール
新冠牧場(夕方)	2009/2/19	99	フリーストール
計		844	

### <<生乳等の処理>>

サンプル採取には、ディスポーザブルの滅菌済ポリスチレン製コニカルチューブ（50ml）を用いたので、研究室に到着後、直ちに冷却遠心機により遠心処理（4℃、1670g、20分）し脱脂乳として凍結保存した（-80℃）。すなわち、遠心処理後、上層に浮いた脂肪層を滅菌薬匙で除去し、滅菌チップを装着したオートピペットで凍結保存用チューブに充填した。一部のサンプルについては、脱脂乳として保存する以外に全乳のまま凍結保存を行った。

宮崎牧場に関しては、4回目の採材時に限り生乳を採材した牛全頭から尾静脈より血液10mlをヘパリン加試験管に採取し、上記の生乳処理と同様の条件で遠心分離して、血漿を-80℃に保存した。また、大学内に繋養している成雌牛の頸静脈から血液200mlを採取し、後述のチャコール処理用に血清を得た。

### <<測定系>>

本研究では、生乳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く(1)、短時間(プロジェステロンの場合は3時間、エストラジオール17βの場合は13時間)に結果を得ることが可能である。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。

TR-FIAを実施するには、概ね下記の準備が必要である。

### ① チャコール処理血清の作製

チャコール処理血清は、ステロイドホルモン濃度測定のための標準濃度溶液の希釈に用いる非常に重要な役割を持っている。牛の血清を無処理のまま使用すると内在する性ステロイドホルモンが測定系を乱すので、チャコール処理によって内在する性ステロイドホルモンを吸着させて血清から除去することが必要となる。したがって、2回反復処理することが薦められる。本研究では、生乳(脱脂乳)中濃度を測定することが主体であるので、チャコール処理をする対象は血清ではなく脱脂乳とすることも可能である。予備試験において、チャコール処理した脱脂乳と血清は、ともに性ステロイドホルモン(プロジェステロン)をほとんど含まないことを確認している。具体的には、下記の手順に従った。

まず、チャコール処理血清作製に使用する血清量を決定した(チャコール処理血清は、標準溶液作製以外に、実際の測定ではゼロ濃度の溶液、およびエストラジオール17β濃度測定時には標準溶液のウェル内希釈にも使用するので、最少でも100ml以上の作製が望ましい)。それに25g/100mlの割合でカーボン(NORIT SX-3)を添加することになるので、必要量のカーボンを超純水により3回洗浄した。すなわち、50mlのコニカルチューブにカーボンと超純水を入れ、ボルテックスにて攪拌後、4℃、1670g、15分で遠心し、上清を取り除いた。超純水による3回の反復洗浄後、PBSを用いて再度洗浄と遠心を行い、上清を取り除いたものを使用した。洗浄済みカーボンを上記の割合で血清と混和し、4℃で10時間以上攪拌した。攪拌には、天板揺動タイプの振盪機を用いた。カーボンを磨り潰す危険性のあるマグネットスターラーや攪拌力が弱い転倒混和機は本用途には不適と考えられた。攪拌完了後、4℃、1670g、60分で遠心し、カーボンと血清を分離した。この後、上記操作をさらに1回反復した。血清中のカーボンを完全に除去するために、濾紙で濾過し(1回)、最終的には0.45μmと0.22μmの滅菌フィルターをダブル装着したシリンジを用いて濾過し、-80℃に保存した。

### ② 標準溶液系列の作製

標準溶液のストックソリューションは、プロジェステロンおよびエストラジオール17βの両方とも、独立行政法人農業生物資源研究所生殖機構研究ユニットの高橋透博士より供与されたものである。プロジェステロンについては、メタノールに溶解した1000ng/ml濃度のものを予め作製しておき、冷暗所に保存しておいた。エストラジオール17βについては、メタノールに溶解した40ng/ml濃度のストックソリューションを予め作製しておき、必要に応じて室温に戻してから下記の操作により標準濃度溶液系列を作製した。

1mlホールピペットにて、ストックソリューションをシリコンコートした試験管に採取し、ヒ

ートブロックに試験管を入れ窒素ガスを吹き付け、メタノールを完全に蒸発させた。その後、試験管を室温に戻し、1mlホールピペットを用いて作製する標準溶液の溶媒（この場合、チャコール処理血清）1mlを採取し、メタノールを蒸発させた試験管に入れた。同試験管にパラフィルムで蓋をして、ボルテックスを行い、4℃で10時間以上放置した。その間、3回試験管をボルテックスした。この性ステロイドホルモンがチャコール処理血清に溶出したものを元に、下記の標準溶液を作製した。

プロジェステロンの場合は、下表に従って各濃度を作製した。

P4 ng/ml	100	36	12	4	1.33	0.33
1000ng/ml-P4 (μl)	200	720	600	600	600	600
チャコール処理牛血清	1800	1280	1200	1200	1200	1800

エストラジオール17βの場合は、下表に従って各濃度を作製した。

E2 pg/ml	200	100	40	20	10	5
40ng/ml-E2 (μl)	10	1000	800	1000	1000	1000
チャコール処理牛血清	1990	1000	1200	1000	1000	1000

両方とも、最高濃度の液とチャコール処理血清を混和し、その中から次段階で必要となる量を分取したものとチャコール処理血清を混和した。それを左（高濃度）から右（低濃度）へ順番に行った。各濃度の標準溶液は、予め自動高圧滅菌機で滅菌したシリコナイズ処理済みチューブ1本当たり110μl（2プレートのアッセイ用）ずつ入れて-80℃に保存した。

### ③ホルモンアッセイ

本研究では、プロジェステロンとエストラジオール17βの測定のために、パーキンエルマー社製のヒト研究用のDelphia測定キットをそれぞれ購入し、牛用にカスタマイズした方法を用いた。使用するアッセイバッファーはキット添付のものではなく別売のものを使用した。標準溶液もキット添付のものではなく上記により自家作製したのものを用いた。アッセイの手順は下記の通りに行った。

まず、凍結保存してある生乳サンプルおよび標準溶液を解凍した。また、プロジェステロンの場合は、キット添付のEuトレーサーおよび抗血清入りの各バイアル瓶に0.3mlの蒸留水を実際の使用前30分前に加えておく必要があった。次いで、測定するサンプル数に応じたプレートの必要枚数を冷蔵庫から出し室温に戻しておいた（各サンプルダブル測定を基本として、標準溶液、コントロール血清の分を除いて、1枚のプレートで40サンプルの測定が可能）。約30分後、プレートをプレート自動ウォッシャーにて1回洗浄し、よく水切りを行った。サンプルを各ウェルに分注した（プロジェステロンの場合は25μl、エストラジオール17βの場合は100μl）。最後に、コントロール血清と標準溶液を低濃度のものから各ウェルに分注した。キット添付の各ホルモンEuトレーサーおよび抗血清を所定の濃度になるようにアッセイバッファーを用いて希釈した。プロジェステロンの場合は、Euトレーサー、抗血清の順に各ウェルに分注し、2時間室温で振盪しながらインキュベーションを行った。エストラジオール17βの場合は、まず抗血清を分注した後、20℃で10時間の振盪インキュベーションを挟んで、Euトレーサーを分注した。その後2時間の振

盪インキュベーションを行った。その後、プレートを自動ウォッシャーにて6回反復洗浄を行い、増強試薬分注、5分間の振盪を経て、ランタノイドの波長をマルチラベルリーダー（ARVO X、パーキンエルマー社製）にて読み取った。実際の濃度は、標準溶液系列の濃度から作成した検量線から読みとった。エストラジオール17β濃度については、検量線から読みとった数値を4で除した値を実際の濃度とした。

### <結果および考察>

成績の解析は下記の内容について行った。本成果報告書提出時における採材済みサンプルの分析完了度は約80%であった。

#### <<アッセイ系の信頼度>>

本研究で用いたプロジェステロン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で、 $r=0.968$ 、 $P<0.0001$ の高い相関が認められた。また、常にサンプルと同時に測定しているコントロール血清（牛の発情期血清と黄体期血清）の濃度から判断して、サンプルについても概ね正確な濃度を示していると推測された。本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。

#### <<生乳測定信頼度>>

本アッセイ系を用いて生乳を直接法（サンプルからの抽出操作を経る間接法と対比して）により測定した場合の信頼度は、同一牛から採取した血漿中の各濃度と比較することによった。その結果、図1と図2に示すように、両方の性ステロイドホルモンとも血漿サンプルと脱脂乳サンプルは非常に相関が高いと考えられ、生乳の直接法による測定は信頼できると判断した。ここで判明したことは、プロジェ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ことであった（2）。

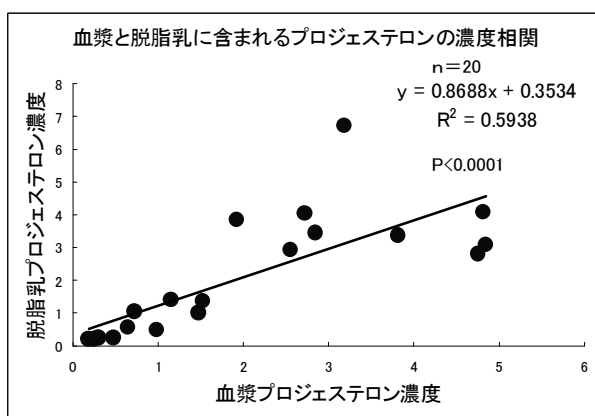


図1

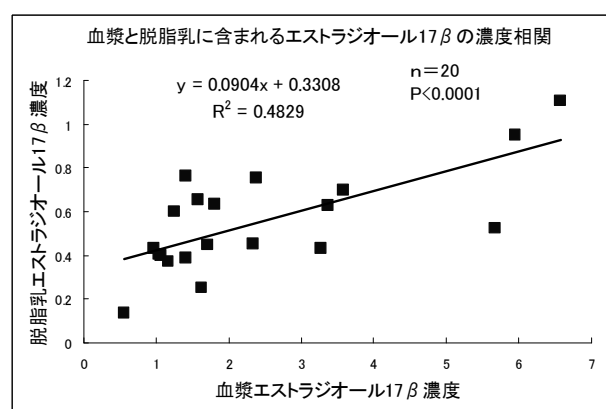


図2

#### <<生乳の処理による差異>>

サンプルの処理について、全乳のままでよいのか脱脂乳として測定した方がよいのかについて検討した。図3と図4に示すように低濃度では相関は高かったが、プロジェステロンでは高濃度になると、エストラジオール17βでは低濃度になると全乳では測定濃度がばらつく傾向にあった

ので、本研究では脱脂乳として濃度測定をする方針とした。図5と図6は、高濃度（プロジェステロンの場合）あるいは低濃度（エストラジオール17βの場合）を示した値を前者の場合2つ、後者の場合3つを削除した場合、さらに相関が高まったことを示している。

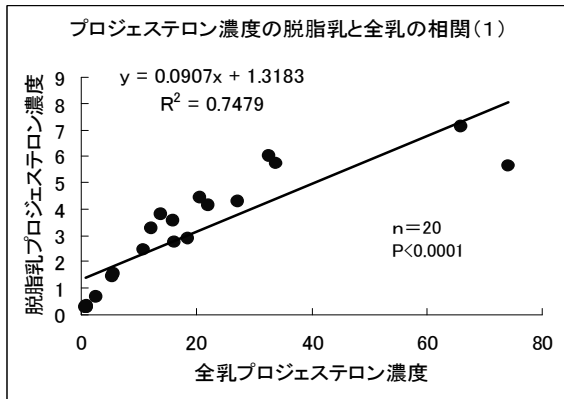


図3

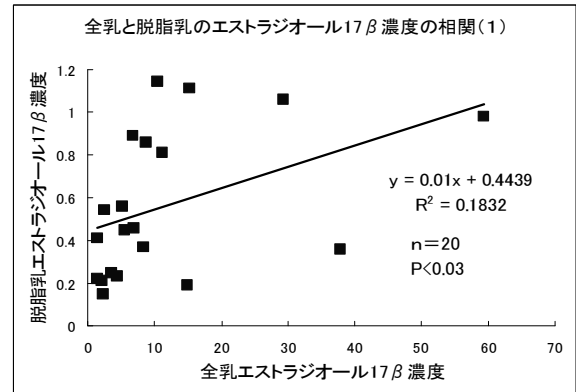


図4

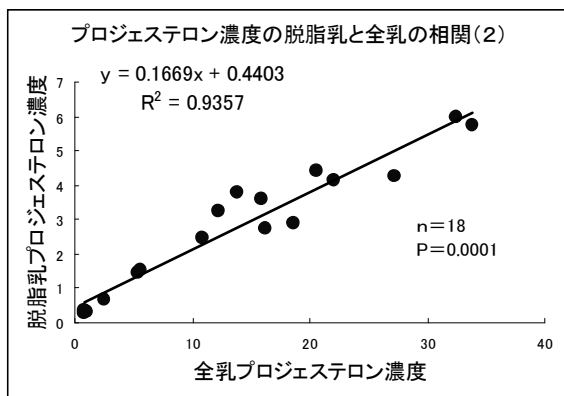


図5

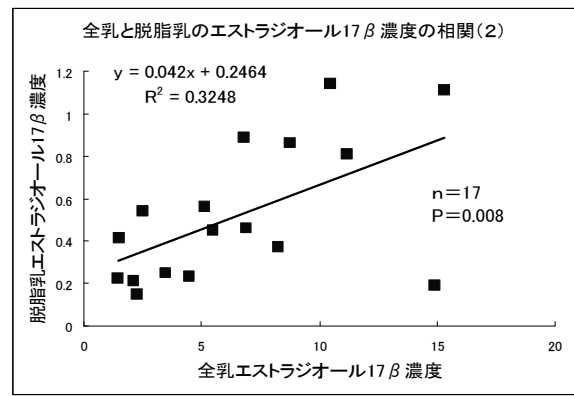


図6

### <<バルク中の濃度と個別濃度との関係>>

生乳はすべての農家において個別には搾られても合乳としてバルククーラーに冷蔵され、さらにミルクタンク車で他農家の合乳と混じることになる。また、バルク乳中の各性ステロイドホルモンの濃度は、個別の生乳中濃度だけではなく個別の乳量にも影響されることになる。図7と図8に個別性ステロイドホルモン濃度とバルク乳中ホルモン濃度の実際を示した。さらに、農家単位でみてみると、搾乳されている牛（生理的空胎、受胎、不受胎、妊否不明の4形態がある）の構成比率もバルク乳の性ステロイドホルモン濃度に影響することが考えられる。

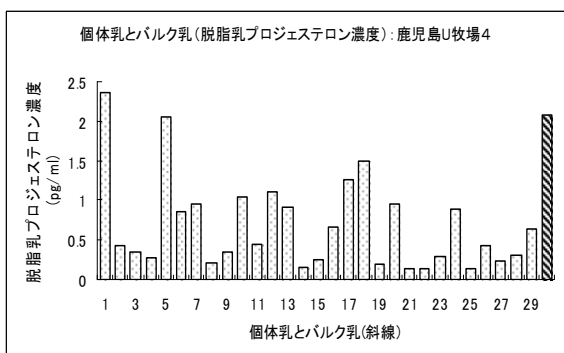


図7

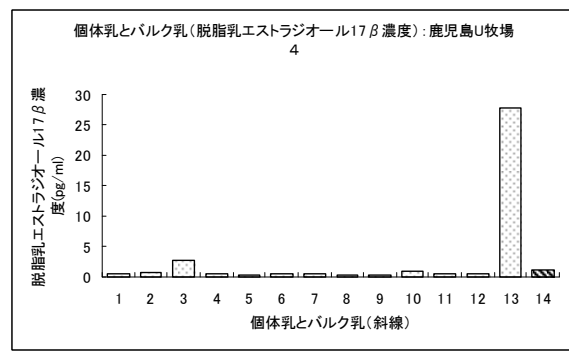


図8

### <<脱脂乳中の各ホルモンの濃度結果>>

まず、本研究の目的である分娩後経過日数および妊娠ステージが性ステロイドホルモン動態に及ぼす影響を述べる。図9に牛妊娠期間中のプロジェステロンとエストラジオール17 $\beta$ の血中濃度変化を示した(3)。それによると、プロジェステロンの場合、受胎牛では交配を行った発情周期の黄体期がそのまま持続する状態となるので、発情後から徐々にその血中濃度を増し、妊娠20日前後でピークに到達した後、その濃度を妊娠期間中にわたって持続する。後半は若干濃度が低下する傾向にあり、分娩が近づくと従ってその濃度は徐々に基底値に向って低下する。一方、エストラジオール17 $\beta$ は妊娠期間の前期から中期にかけては低濃度で推移するが、後半分娩が近づくと連れて急上昇して分娩とともに濃度を急激に低下させる。これは、エストロジェン(エストラジオール17 $\beta$ を含む総体)が胎盤で産生されている証拠と考えられている。生乳中のステロイドホルモン動態は、当然のことながら血中の性ステロイドホルモンの動態を反映していると考えられる。

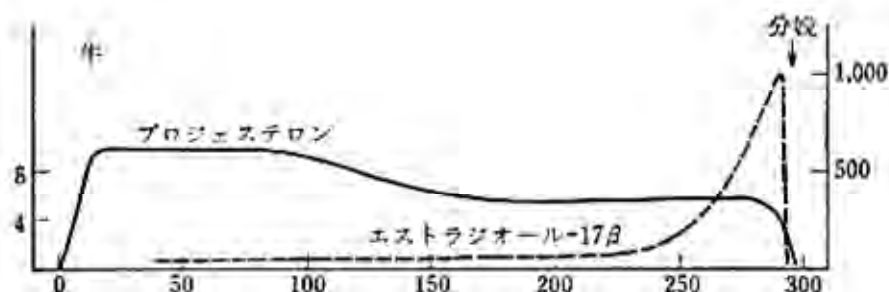


図9 牛の妊娠中の血中ホルモン濃度変化

家畜繁殖学全書(朝倉書店)より引用

分娩後日数が性ステロイドホルモン動態におよぼす影響を考える場合、分娩後日数の影響のみを抽出するには、分娩後の生理的空胎期間(牛の栄養状態等にも影響されるが、通常は2ヵ月間)が過ぎた後に交配され受胎した牛は除く必要がある。また、交配後妊娠診断が実施されていない牛(通常、妊否不明に分類されている)も除くのが望ましいと考えられた。したがって、その条件を備えている牛は、生理的空胎牛および不受胎牛の2通りが考えられる。それらの数値をみると、不受胎の原因にもよるが、正常な発情周期を示す牛では採材したタイミングが発情期であればエストラジオール17 $\beta$ 濃度が高く、黄体期であればプロジェステロン濃度が高い結果となることは、それらの血漿中濃度と脱脂乳中濃度の相関の高さから容易に想像ができた。また、連続4回にわたって同一牛から採材して、同一日に両方の性ステロイドホルモン濃度が低い場合は、卵巣静止等の原因で不受胎に終わっていることがある程度類推できた。このことは、採材農家にデータをフィードバックすることによって確認できた。次に、生理的空胎(分娩後、生理的な卵巣静止の時期)期間中の両ホルモンの動態は、不受胎牛に比べて低濃度で推移した。これは、分娩後の生理的卵巣静止を反映しているものと考えられた。図10には不受胎牛の、図11には生理的空胎牛のそれぞれの分娩後日数と脱脂乳プロジェステロン濃度の相関を示した。一牧場のデータではあるが、不受胎牛の脱脂乳プロジェステロン濃度と分娩後日数との関係は認められなか

った。一方、生理的空胎牛では、生理的卵巣静止の状態から徐々に卵巣が活動を再開させる時期にかかっているため、分娩後日数が経過するに従って緩やかに増加する傾向がみられた（図12、図13）。

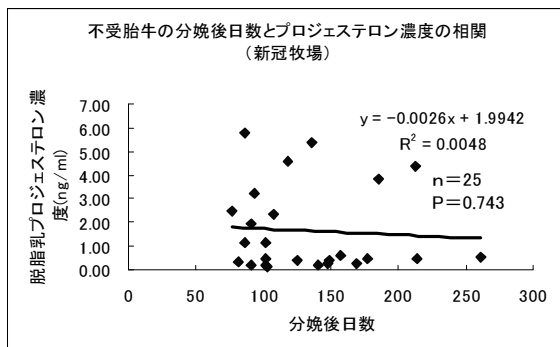


図10

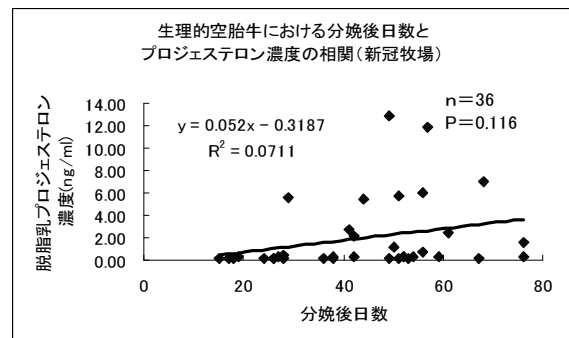


図11

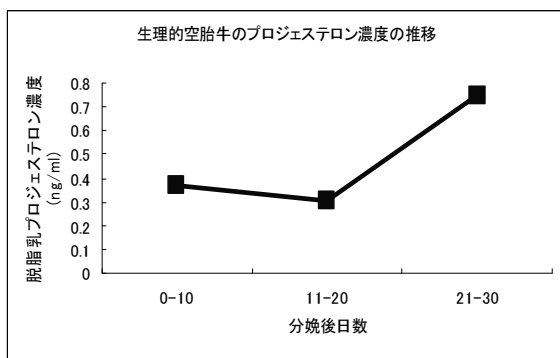


図12

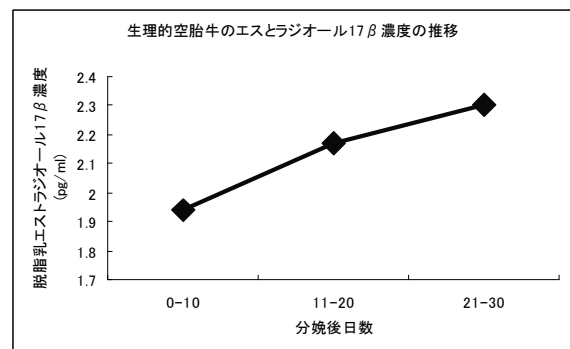


図13

妊娠ステージ（妊娠日齢）が脱脂乳中の性ステロイドホルモン濃度に及ぼす影響については、全体と牧場毎に集計した。図14と図15に、それぞれプロゲステロン濃度と妊娠ステージによる推移、エストラジオール17βと妊娠ステージによる推移を示した。これらは特定の牛を妊娠期間中追跡して得たサンプルによるものではなく、多数の牛の妊娠ステージと各ホルモン濃度のデータセットの集合体である。このような性格のデータではあるが、多少の上下はあるものの概ね図9に示した血中動態と大きくかけ離れているとは考えにくい。図16と図17に、全体のデータから集計した妊娠ステージと各性ステロイドホルモンの相関を示したが、両方の性ステロイドホルモンとも妊娠ステージの進行に伴い有意に上昇して行く傾向はみられなかった。また、受胎牛における両方の性ステロイドホルモンの相関についてみたが（図18）、両者は緩やかな相関を保持していることが推察された。これは、妊娠を維持する上からプロゲステロンはもとより、エストラジオール17βも重要であることの現れであると考えられる。



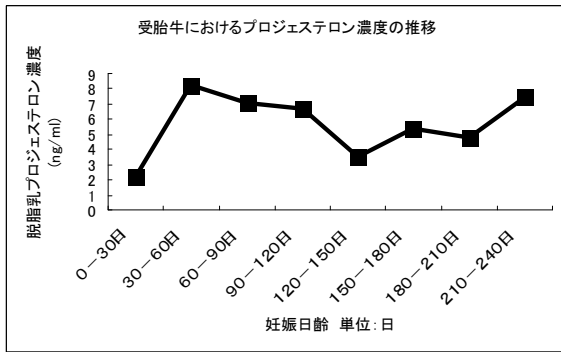


図14

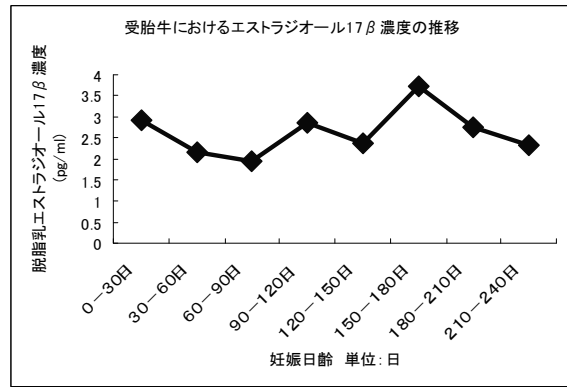


図15

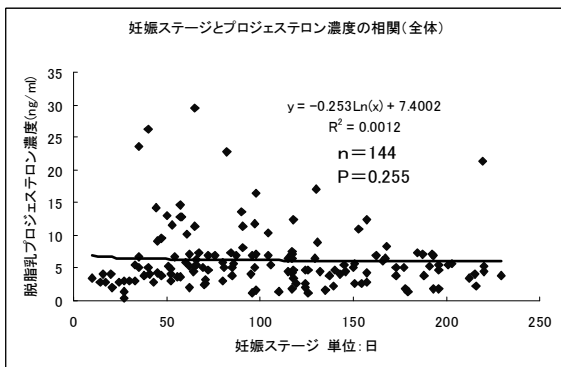


図16

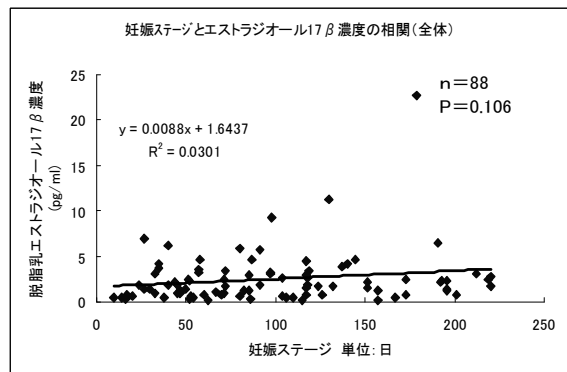


図17

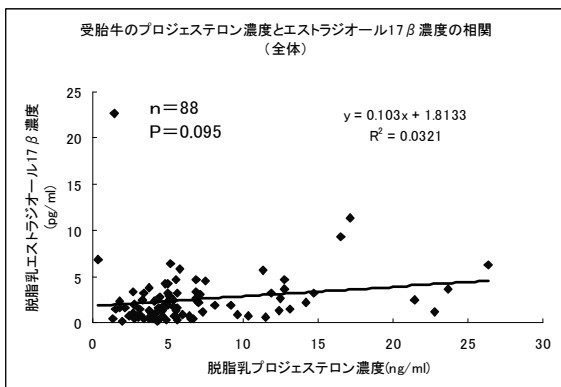


図18

次いで、牧場毎にみた場合、唯一、霧島牧場だけが妊娠ステージの進行に伴って性ステロイドホルモンが上昇傾向にある結果となった（図19と図20）。また、性ステロイドホルモン同士の相関も図18の結果と比較して相関係数が高い結果であった（図21）。他の牧場については霧島牧場ほど強い傾向はみられなかった。図22～図33は、牧場名では岩手牧場、福島牧場、鹿児島A牧場、宮崎牧場の順に、それぞれの牧場では、妊娠ステージとプロジェステロン濃度、妊娠ステージとエストラジオール17β濃度、プロジェステロン濃度とエストラジオール17β濃度との各相関の順に示した。図34には、新冠牧場のデータを示した。ここでみられた牧場間の差が、意味のあるものであるのかどうかについては今回の調査だけでは明らかにすることはできなかった。しかし、立地場所の気候・土壌、給与飼料・水などの飼養環境が影響を及ぼしている可能性を考慮する必要があるかも知れない。

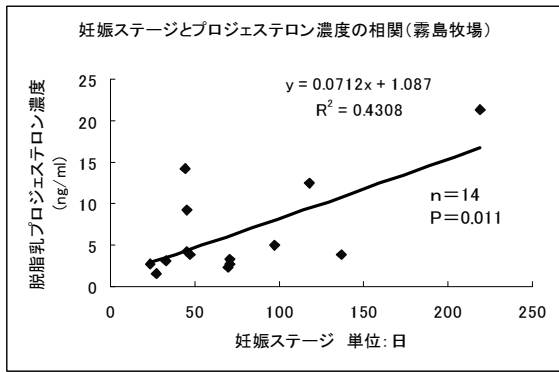


図 19

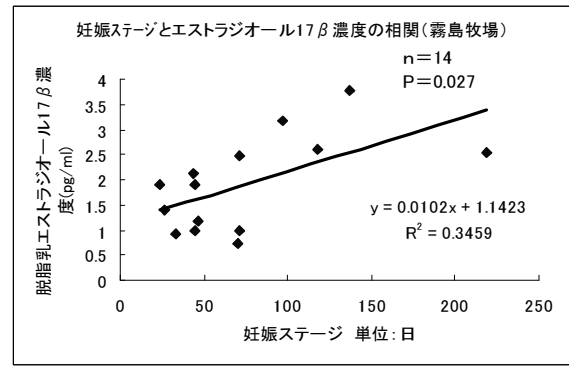


図 20

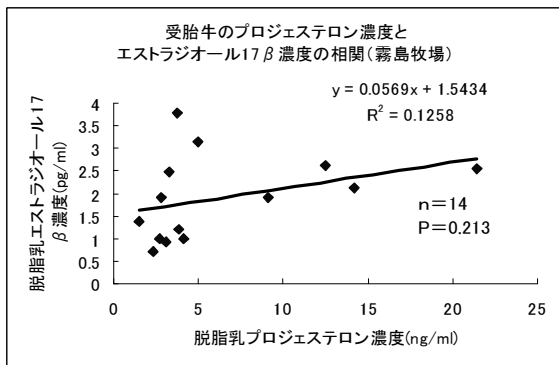


図 21

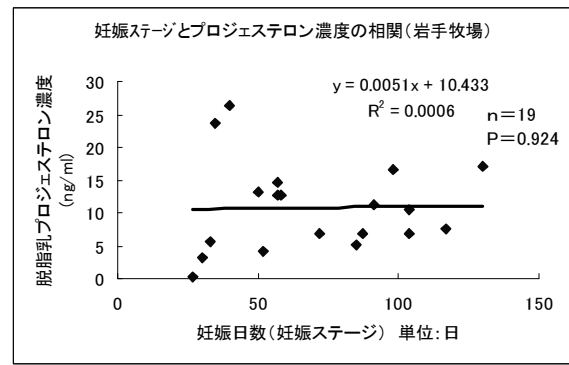


図 22

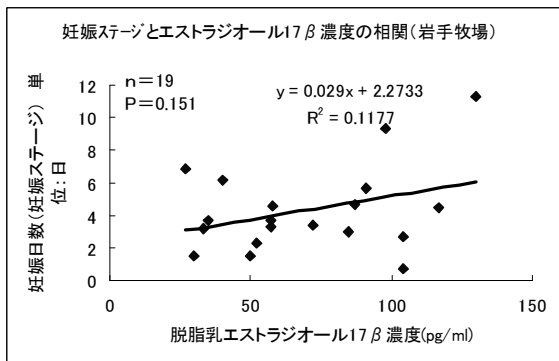


図 23

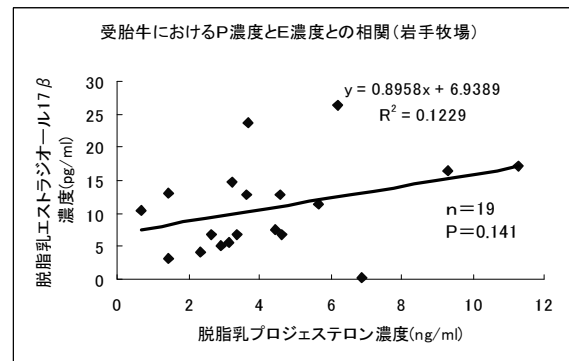


図 24

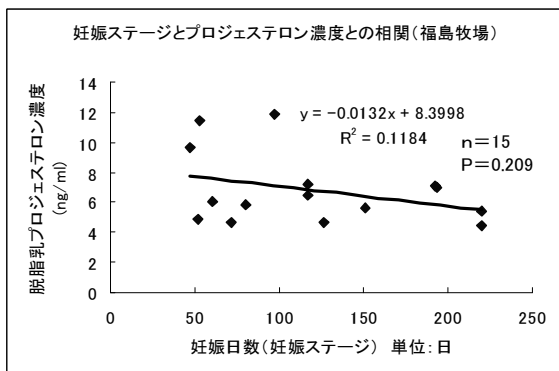


図 25

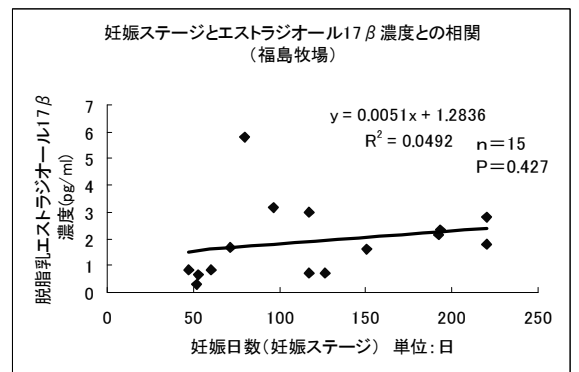


図 26

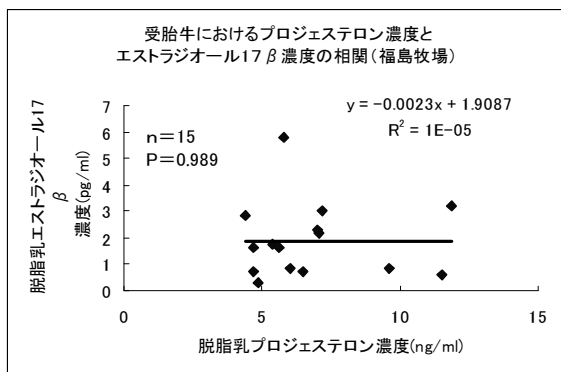


図 27

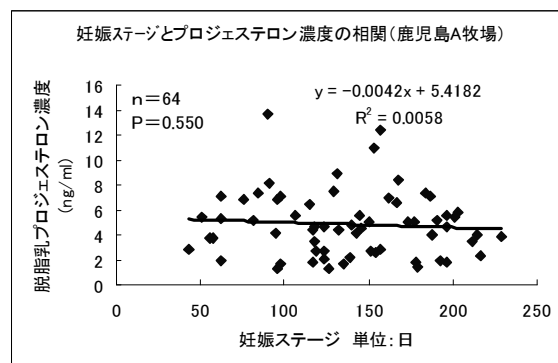


図 28

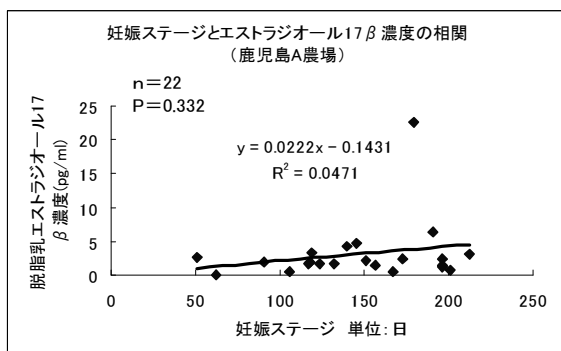


図 29

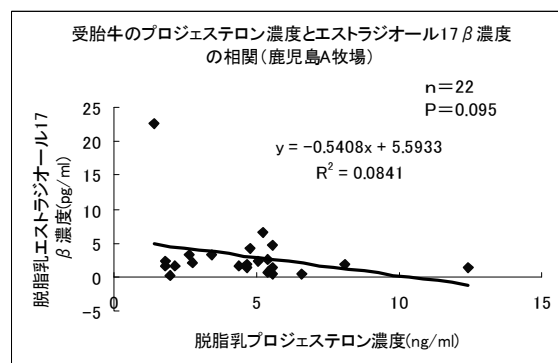


図 30

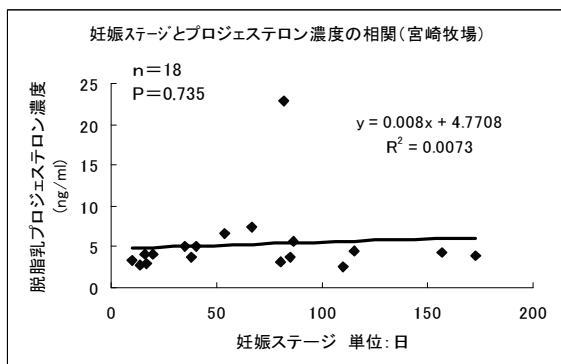


図 31

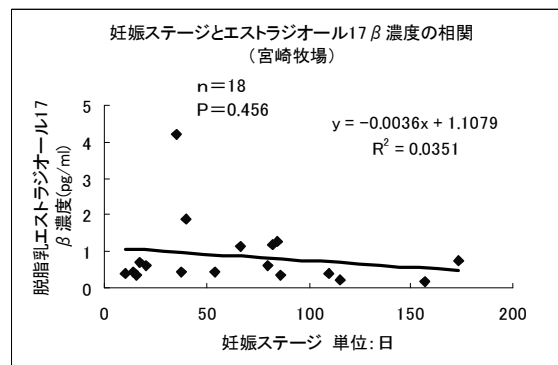


図 32

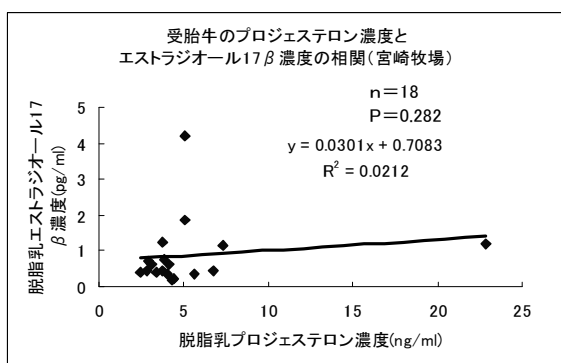


図 33

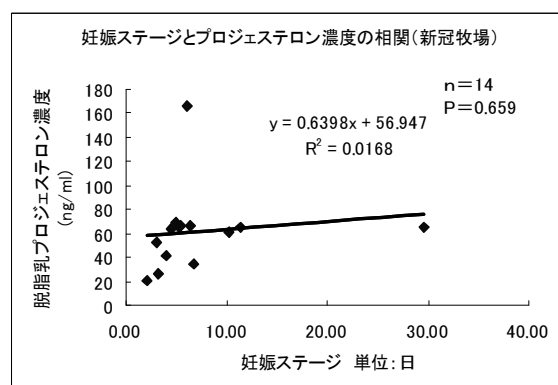


図 34

乳量と両方の性ステロイドホルモン濃度との関係については、上記の結果から、全体としてみるよりも個々の牧場毎に調査して飼養環境等が何らかの意味を有しているかどうかを考察することに意義が考えられたことから、4牧場について個々にデータを示した。福島牧場における乳量とプロジェステロン濃度の相関を図35に、乳量とエストラジオール17β濃度の相関を図36に示した。同様に、宮崎牧場を図37と図38に、霧島牧場の初回採材を図39と図40に、霧島牧場の第2回採材を図41と図42に、最後に新冠牧場における乳量とプロジェステロン濃度の関係を図43にそれぞれ示した。大方の牧場で乳量と性ステロイドホルモンの関係は強くないと思われたが、福島牧場では乳量の増加に伴ってプロジェステロン濃度が低下する傾向がみられた。乳汁は血液を原料に乳腺細胞で合成されることから、性ステロイドホルモンの産生母地における生産量が一定であれば乳量が多くなると希釈されると考えるのが妥当かも知れない。

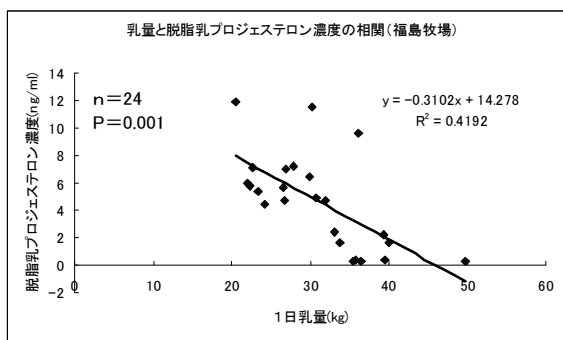


図 35

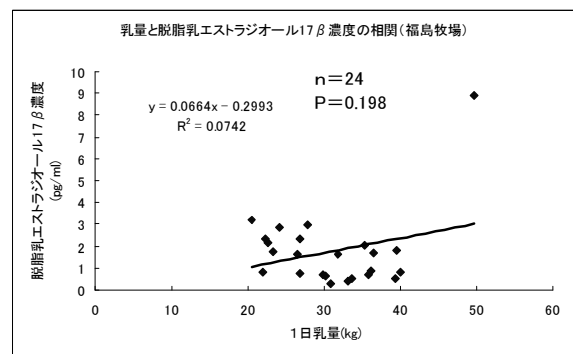


図 36

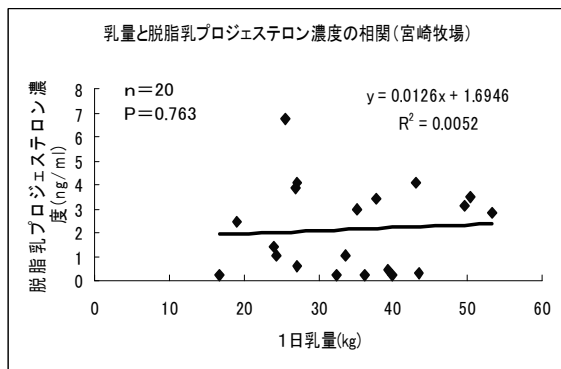


図 37

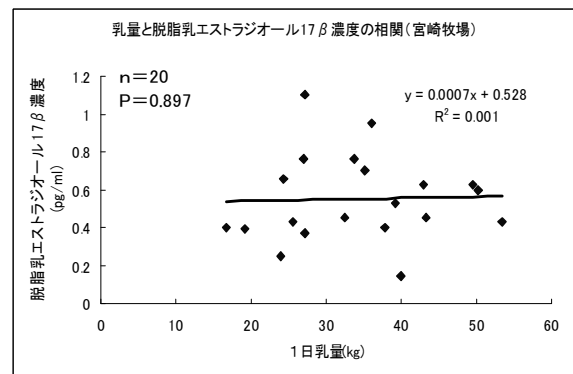


図 38

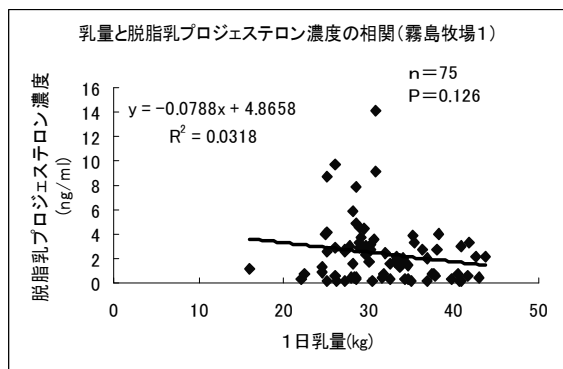


図 39

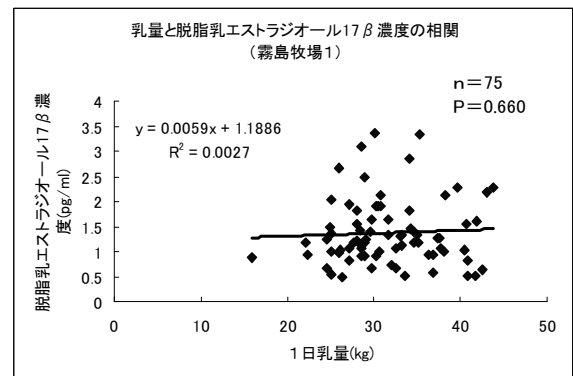


図 40

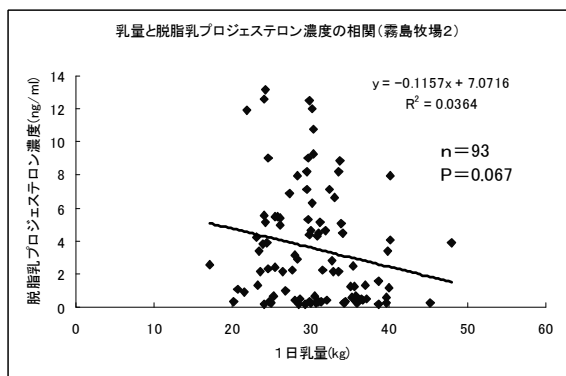


図 41

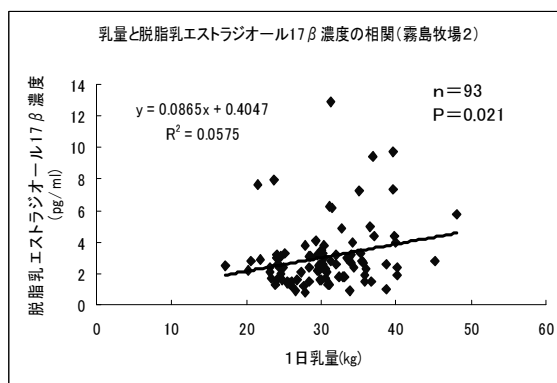


図 42

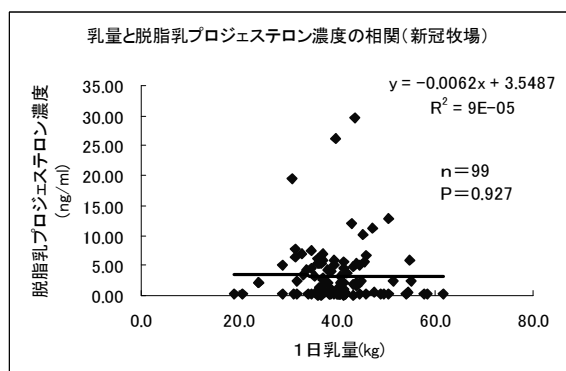


図 43

個々の酪農場には、子牛、育成牛を除く成雌乳牛のうち特別な理由で交配されない牛（例えば、胚を採取するための供胚牛）以外は、搾乳牛と乾乳牛に分類できる。本研究では、搾乳牛のみを対象とすることから、その内訳では生理的空胎牛、交配はしたが受胎が未確認である妊否不明牛、受胎牛、それと交配を試みるが受胎しない不受胎牛の4形態となる。この4形態の分類に基づいて、両方の性ステロイドホルモン濃度の平均値を特定の2牧場を抽出して算出した。表2には、新冠牧場における搾乳牛の状態別プロジェステロン濃度の平均値±標準偏差を示した。表3と表4には、岩手牧場の搾乳牛の状態別プロジェステロン濃度、エストラジオール17β濃度をそれぞれ示した。それらによると、プロジェステロン濃度においては、妊娠継続中の牛（受胎牛）が他の状態の牛よりも高い傾向にあることは明らかであった。次いで、妊否不明牛で濃度が高い傾向であった。これは、妊否不明牛の中には受胎している牛が混じっていることから当然の結果と考えられた。第3位は牧場間で異なっているが、これはそれぞれを構成する牛の分娩後日数や不受胎の原因がさまざまであるからと考えられた。一方、エストラジオール17β濃度においては、各状態間でプロジェステロンのような明瞭な差はみられなかった。これは、プロジェステロンが妊娠を維持するための必須ホルモンであるのに対して、エストラジオール17βは妊娠末期を除いてプロジェステロンほどは重要な役割を担っていないためと考えられる。

表2

搾乳牛の状態による脱脂乳  
プロジェステロン濃度の影響 1

搾乳牛の状態	プロジェステロン濃度
生理的空胎(n=36)	1.96±3.25
妊娠継続(n=14)	7.34±6.90
妊否不明(n=20)	4.12±4.39
不受胎(n=27)	2.59±5.06

単位: ng/ml 新冠牧場 調査牛97頭

表3

搾乳牛の状態による脱脂乳  
プロジェステロン濃度の影響 2

搾乳牛の状態	プロジェステロン濃度
生理的空胎(n=36)	3.99±4.21
妊娠継続(n=19)	10.8±6.83
妊否不明(n=8)	4.72±4.28
不受胎(n=22)	3.76±3.49

単位: ng/ml 岩手牧場 調査牛85頭

表4

搾乳牛の状態による脱脂乳  
エストラジオール17β濃度の影響

搾乳牛の状態	エストラジオール17β濃度
生理的空胎(n=36)	3.81±2.78
妊娠継続(n=19)	4.24±2.57
妊否不明(n=8)	3.09±1.21
不受胎(n=22)	5.64±5.54

単位: pg/ml 岩手牧場 調査牛85頭

## <<市販牛乳中の各ホルモン濃度>>

2 サンプルについて全乳（凍結保存）のままプロゲステロン濃度を測定した。その結果、3.51ng/mlと4.59ng/mlであった。それらの殺菌条件は、両者とも130℃、2秒間であった。少数例ではあるが、市販牛乳に性ステロイドホルモンが含まれていることが明らかとなった（4）。

## <まとめ>

本研究の目的のひとつであった生乳に含まれる性ステロイドホルモンの放射性同位元素を用いないアッセイ系の検討については、脱脂乳をサンプルとして用いて抽出操作を経ないで性ステロイドホルモン濃度を測定することが可能な系を確立することができた。また、そのアッセイ系を応用して、牛生乳中には、由来する牛の状態（すなわち、生理的空胎、受胎、不受胎、妊否不明の4種の状態）にかかわらずプロゲステロンとエストラジオール17βの性ステロイドホルモンが含まれていることが改めて明らかとなった。性ステロイドホルモンのうち、プロゲステロン濃度は受胎牛で高い傾向があった。一方、エストラジオール17β濃度は牛の状態にかかわらず、ほぼ一定であった。

血中の性ステロイドホルモンの分析から明らかなように、エストロジェン濃度が急激に高くなる妊娠220日以降は、通常の飼養管理では分娩に備えて乾乳（搾乳を強制的に中止して乳汁分泌を抑え、分娩後の泌乳開始に備えて乳腺組織の再生を図る処置）されるため、その時期の生乳は食品として市場に出回ることはない。また、天然型プロゲステロンを吸着させた牛の膈内留置型の徐放剤が発情同期化、受胎促進、卵巢機能障害の治療などに広く用いられているが、この徐放剤の使用期間中であっても生乳の廃棄処置は必要ない。これは妊娠によるプロゲステロン濃度の増加程度であれば、ヒトに対する安全域内（食品となった場合）であると認知されていることから、この徐放剤の使用による血中プロゲステロン濃度の増加が問題になることはないという根拠に基づいている（5）。

今回、全国7箇所の牧場で生乳を採材したが、牧場間で性ステロイドホルモンと妊娠ステージとの関係が異なる傾向がみられたことから、飼養環境がその濃度に影響を与えている可能性が考えられた。また、より精密なデータを得るには、特定の個体を分娩直後の生理的空胎期から受胎確認、妊娠継続、乾乳直前までを追跡する試験が必要である。

採材から生乳処理までの時間が農家間で異なっていた。この要因が測定結果にどのように影響しているかは、本研究では検討しなかった。

性ステロイドホルモンが牛乳を飲用する人体にどのような影響を及ぼしているのかに関しては本研究の枠を超えるものである。また、人体に対する影響をみるには、周到に計画された疫学研究を実施する必要があると考える。

## <引用文献>

1 Takahashi T., Hamanaka S., Ikeda S., Kobayashi J. and Hashizume K. A direct time-resolved fluorescent immunoassay (TR-FIA) for measuring plasma progesterone concentration in the Sika Doe (*Cervus Nippon centralis*). J Reprod Dev 47(2): 119-123 (2001).

2 Meisterling E.M. and Dailey R.A. Use of concentrations of progesterone and

estradiol-17  $\beta$  in milk in monitoring postpartum ovarian function in dairy cows. J Dairy Sci 70: 2154-2161 (1987).

3 家畜繁殖学全書、望月公子編、東京、1984、朝倉書店

4 食品のリスク管理の実施状況に関する調査報告書（市販牛乳及び脱脂粉乳中における牛の性ホルモンの含有量実態調査調査分）内閣府食品安全委員会、平成15年度食品安全確保総合調査、平成16年3月、財団法人日本食品分析センター

5 Chenault J.R., Hornish R.E., Anderson Y.C., Krabill L.F., Boucher J.F. and Prough M.J. Concentrations of progesterone in milk of cows administered an intravaginal progesterone insert. J Dairy Sci 86: 2050-2060 (2003).