乳牛における脱脂乳中プロゲステロン濃度 測定値に及ぼす乳汁採取条件の影響

岡田啓司¹⁾ 佐藤 繁¹⁾

鈴木利行¹⁾ 金田義宏²⁾

(平成元年12月7日受付・平成2年6月8日受理)

Effect of Collection Method on Skim Milk Progesterone Concentration in Cows
KEIJI OKADA*, SHIGERU SATO, TOSHIYUKI SUZUKI and YOSHIHIRO KANEDA (* Veterinary Clinic
and Training Center, Miyagi Prefectural Federation of Agricultural Mutual Aid
Association, Kurokawa, Miyagi 981-36)

SUMMARY

The relationships between progesterone levels in skim milk and collection methods of samples were investigated. The progesterone levels in skim milk differed significantly from quarters and from collection times. The differences of mean progesterone concentration in intra-quarters were from 0.4 ng/ml to 1.7 ng/ml at various collection times. Progesterone levels of before milk were significantly lower than those of bowl milk at morning milking in 4 cows, their plasma progesterone levels were over 5.0 ng/ml. Although there were no significant differences between bowl milk, before milk and after milk in 6 cows, their plasma progesterone levels were under 5 ng/ml. Progesterone levels in skim milk collected 4 hrs and 6 hrs after morning milking were significantly lower than those of bowl milk. Progesterone levels of skim milk were significantly lower than those of plasma, but positive correlation was recognized between both levels, except milk collected 6 hrs after milking.—**Key Words** : progesterone, skim milk, collection methods.

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 43, 650~654 (1990)

要 約

脱脂乳中のプロゲステロン (P) 測定を野外の臨床繁殖試験および検査に応用する目的で、乳汁の採取条件と P 濃度の関係を EIA により検討した。

同一個体の4分房それぞれの脱脂乳中のP濃度はいずれの採取時期においても差異がみられ、その幅は0.4 ng/ml から1.7 ng/ml、平均0.9 ng/mlであった。乳汁の採取時期ごとのP濃度は、血漿中P濃度が高い群(5 ng/ml以上)では混合乳に比べ朝の前搾り乳は有意に低い値を示したが、血漿中P濃度が5 ng/ml未満の群では朝の前搾り乳、混合乳および後搾り乳間に有意の差は認められなかった。朝の搾乳後2、4および6時間目に採取した乳汁の脱脂乳中P濃度は、朝の混合乳と比べ搾乳後4および6時間には有意に低い値を示し、特にP濃度の高い例において著明な低下が認められた。脱脂乳中のP濃度は血漿中のそれと比べ、いずれの採取時期においても有意に低い値を示したが、搾乳後6時間を除いて両者の間に有意の正の相関が認められた。なおP濃度と乳成分との間に一定の関係はみられなかった。

以上のことから、脱脂乳中のP測定を目的とした乳汁の採取は、その方法および時期を一定にすることが必要で、混合乳を用いることが適当であると考えられた。

乳汁中のプロゲステロン(以下「P」と略す。)濃度は血液中のそれと同様に変動し、黄体機能を推定する方法として利用できる^{5,6)}ことが明らかにされて以来、乳汁中のP測定は乳牛の早期妊娠診断^{1,7,8,10,14,21)}、発情

の確認^{3,9)}、卵巣疾患の診断^{15,21)}などへの応用が検討されている。乳汁中Pの大部分は脂肪中に含まれる^{2,6)}ため、全乳中のP濃度は乳脂率の影響を受けて変動する^{2,4,6,19,20,21,23)}。いっぽう脱脂乳中のP濃度は乳脂率の影響を受けないので乳汁の採取方法による差はなく、いつ、どの分房から乳汁を採取してもよい^{13,15)}とされているが、脱脂乳中P測定のための乳汁の採取条件について基礎的に検討した報告はあまり知られていない。

¹⁾ 宮城県農共連家畜診療研修所(黒川郡大衡村平林38)

²⁾ 岩手大学農学部(盛岡市上田3-18)

Key Words : プロゲステロン, 脱脂乳, 採取条件.

著者らは、脱脂乳中の P 測定を野外臨床および RI 施設を持たない臨床研究機関での臨床試験等に応用する目的で、乳汁の採取条件と EIA による P 濃度の関係を検討した。

材料および方法

供 試 牛

供試牛は、2戸の酪農家に飼養されている妊娠中期のホルスタイン種乳牛 14 頭である。これらの牛はいずれも臨床的に異常を認めず、その乳汁がカリフォルニア・マスタイトシス・テスト（以下「CMT」と略す。）変法で陰性を示したものである。供試牛の産歴は 2～4（平均 3.2）産で、1 日当たりの乳量は 15～28（平均 22）kg であった。なお、これら 2 戸の酪農家の搾乳時刻はいずれも朝は午前 6 時頃、夕方は午後 6 時頃であった。

試料の採取および保存

乳汁は、朝の搾乳時にミルカーをつける前に手搾りした前搾り乳、搾乳後バケツをよく攪はんしてから採取した混合乳、およびミルカーをはずした直後に手搾りした後搾り乳、さらに朝の搾乳終了後 2、4 および 6 時間に手搾りで採取した乳汁である。No. 1～4 の 4 例では混合乳以外はそれぞれ各分房ごとに約 60 ml 採取し、他の 10 頭（No. 5～14）では、各分房からはほぼ均等になるように計 60 ml を、5～6 回の捨て搾りを実施した後採取した。採取した乳汁は直ちに氷水中で冷却し、一部は 10 ml の試験管に移し、3,000 rpm、30 分間遠心し

て脂肪層を除去し、得られた脱脂乳は別の小試験管に移して -20℃ に保存した。乳成分測定のための乳汁は 4℃ に保存した。

血液は朝の搾乳終了後 4 時間に、頸静脈からヘパリン加真空採血管を用いて採取し、ただちに 3,000 rpm、10 分間遠心して血漿を分離し、得られた血漿は -20℃ に保存した。

脱脂乳および血漿中 P 濃度の測定

P 濃度の測定は市販の EIA キット（P 測定 EIA キット「テイゾー」、帝国臓器製薬）を用いて採取後 1 週間以内に実施した。脱脂乳は測定直前に融解後、安全性を高めるため再度脱脂操作（3,000 rpm、30 分間遠心し上層を除去）を実施した後、測定に供した。なお本キットの測定内変動係数は 5.9～9.2%、測定間変動係数は 7.3～13.1% と小さく、二抗体法 EIA と高い相関のあることが証明されている¹⁶⁾。

乳成分の測定

乳成分の測定はいずれも採取した翌日に行った。乳脂肪については 4 頭（No. 5～8）でゲルベル氏法、他の 10 頭で乳蛋白および乳糖などとともに自動測定装置（MILKO SCAN 104, A/S N. Foss Electric, Denmark）を用いて測定した。

統 計 処 理

各数値間の有意差の検討は t 検定により、相関は相関分析により実施した。

図 1 分房ごとの脱脂乳中プロジェステロン濃度

表1 乳汁の採取時期ごとの脱脂乳中プロジェステロン濃度と乳成分

採取時期 ¹⁾	プロジェステロン濃度 (ng/ml)	乳脂肪 (%)	乳蛋白 (%)	乳糖 (%)
前搾り	2.7 ± 0.5	2.5 ± 0.7**	3.5 ± 0.6	4.6 ± 0.4
混合乳	3.4 ± 1.0	4.2 ± 0.5	3.4 ± 0.6	4.6 ± 0.3
後搾り	3.2 ± 1.5	7.8 ± 2.3**	3.1 ± 0.8	4.4 ± 0.3
搾乳後 2 時間	2.8 ± 1.3	6.7 ± 1.8**	3.1 ± 0.7	4.1 ± 0.3
搾乳後 4 時間	2.3 ± 0.9*	5.3 ± 1.4*	3.1 ± 0.6	4.1 ± 0.4
搾乳後 6 時間	2.2 ± 0.8**	3.9 ± 1.1	3.4 ± 0.7	4.0 ± 0.7

1) 朝の搾乳時および搾乳後 (n = 10, Mean ± SD) * : p < 0.05, ** : p < 0.01 (混合乳との有意差) 血漿中プロジェステロン濃度の平均: 4.1 ± 1.3 ng/ml

成 績

乳汁の採取分房と脱脂乳中 P 濃度

乳汁を採取した分房ごとの脱脂乳中 P 濃度を図 1 に示した。

分房ごとの P 濃度は 4 頭ともいずれの採取時期においても差異がみられ、同一時刻の 4 分房の乳汁の P 濃度の差は 0.4 ng/ml から 1.7 ng/ml, 平均 0.9 ng/ml であった。なお No.2 では、搾乳後 6 時間までの間のいずれの採取時期においても左後分房乳の P 濃度はほかの分房と比べ低い値で推移した。4 分房の乳汁の平均 P 濃度は、血漿中 P 濃度が 5 ng/ml 以上を示した No.1 と 2 では搾乳後の時間の経過に伴い低下する傾向が認められたが、血漿中 P 濃度が 5 ng/ml 未満の No.3 と 4 ではほとんど変化が認められなかった。

乳汁の採取時間と脱脂乳中 P 濃度

乳汁の採取時期ごとの脱脂乳中 P 濃度を表 1 に示した。

10 頭の平均値では、朝の前搾り乳は混合乳および後搾り乳と比べやや低い値を示したが、3 者間で有意の差は認められなかった。また搾乳後は P 濃度がしだいに低下して、搾乳後 4 および 6 時間にはいずれも混合乳と比べ有意に低い値を示した。

血漿中 P 濃度が 5 ng/ml 以上の 4 頭 (A 群; 5.0 ~ 6.3 ng/ml) と 5 ng/ml 未満の 6 頭 (B 群; 2.4 ~ 3.7 ng/ml) に大別し、それぞれの群の採取時期ごとの脱脂乳中の P 濃度を図 2 に示した。

A 群では混合乳の値に比べ前搾り乳は有意に低い値を示したが、後搾り乳では差がみられず、また搾乳後の時間の経過に伴い P 濃度の低下が著明に認められ、搾乳後 4 および 6 時間には有意に低い値を示した。いっぽう B 群では混合乳の値に比べ前搾り乳と後搾り乳ではいずれも差がみられず、搾乳後 2 および 4 時間には有意に低い値を示したが、搾乳後の時間の経過に伴う P 濃度の変化は少なかった。しかし、搾乳後 6 時間には 1 ng/ml 前後の低値を示すものも認められた。

図2 採取時期ごとの脱脂乳中プロジェステロン濃度

乳成分と脱脂乳中 P 濃度の関係

乳成分と脱脂乳中 P 濃度の関係は代表例を表 2 に示した。分房ごとの乳脂率は各個体ともいずれの採取時期においても差異が認められ、また 4 分房の平均値は搾乳後の時間の経過にともない低下する傾向が認められた。乳蛋白および乳糖は分房ごとに大きな差異はみられず、また乳成分と P 濃度の間に一定の関係は認められなかった。

乳汁の採取時期ごとの乳成分を表 1 に示した。乳脂率は 10 頭の平均値では混合乳と比べ前搾り乳は有意に低く、後搾り乳は有意に高い値を示した。また搾乳後 6 時間までの間はしだいに低下したが、2 および 4 時間には混合乳と比べ有意に高い値を示した。

乳蛋白は採取時期による差はみられず、また乳糖は搾乳後 2 時間に混合乳と比べ有意に低い値を示したほかは、特に差異は認められなかった。なお P 濃度と乳脂率、乳蛋白および乳糖との間に有意の相関は認められなかった。

前記の血漿中 P 濃度が 5 ng/ml 以上の A 群と 5 ng/ml 未満の B 群の乳脂率は図 3 に示すとおりいずれの採取時期においてもほぼ同様の値であり、両群の間に有意の差は認められなかった。

表2 乳汁の分房ごとのプロジェステロン (P, ng/ml), 乳脂肪 (a, %), 乳蛋白 (b, %), 乳糖 (c, %) の濃度 (牛 No. 1)

採取時期	前		後	
	左	右	左	右
	P / a / b / c	P / a / b / c	P / a / b / c	P / a / b / c
前搾り	3.5/1.0/2.9/4.7	4.3/1.7/2.9/4.6	4.0/1.3/2.9/4.7	3.9/1.3/2.9/4.7
混合乳		(4.1/3.6/2.9/4.6)		
後搾り	4.8/6.2/2.4/4.5	3.8/6.6/2.6/4.3	3.2/6.2/2.7/4.4	3.8/6.5/2.6/4.4
搾乳後 2 時間	3.0/6.1/2.5/4.3	2.9/6.0/2.6/4.1	2.3/6.5/2.5/4.2	2.8/6.4/2.6/4.2
搾乳後 4 時間	1.7/5.6/2.6/4.3	1.9/4.9/2.6/4.0	2.6/4.8/2.6/4.2	2.4/4.6/2.7/4.3
搾乳後 6 時間	2.2/3.8/2.7/4.4	1.9/3.4/2.6/4.1	2.3/3.1/2.7/4.4	2.1/3.2/2.7/4.4

表3 脱脂乳中Pの血漿中Pに対する百分比および相関

採取時期	比率 (%) ¹⁾	相関係数 ²⁾
前搾り	70 ± 16	0.633*
混合乳	84 ± 10	0.621**
後搾り	74 ± 17	0.951**
搾乳後 2 時間	66 ± 16	0.833**
搾乳後 4 時間	57 ± 11	0.840**
搾乳後 6 時間	55 ± 20	0.497

1) (脱脂乳中P/血漿中P) × 100 2) 脱脂乳中Pと血漿中Pの相関, *: p < 0.05, **: p < 0.01

図3 採取時期ごとの乳脂肪率

脱脂乳中と血漿中P濃度の比較

脱脂乳中と血漿中のP濃度の関係は表3に示した。

脱脂乳中のP濃度は、血漿中の値にくらべいずれの採取時期においても有意に低い値を示した。血漿中のP濃度を100%としたときの脱脂乳中の値は混合乳で最大で、平均84%であった。血漿中と脱脂乳中のP濃度との間に、搾乳後6時間を除くほかの採取時期においていずれも有意の正の相関が認められた。

考 察

乳汁を採取した分房ごとの脱脂乳中P濃度は、各個体ともいずれの採取時期においても差異が認められた。

また、脱脂乳中P濃度と乳成分との間に一定の関係は認められなかった。健康な乳房では分房ごとの乳汁に成分の差がないことが知られている²⁴⁾。いっぽう乳房炎に冒された乳汁では、カゼイン含量の減少や血液由来蛋白の増加など乳成分に変化のあること¹¹⁾が知られている。今回の供試牛はいずれの分房の乳汁もCMT変法で陰性であり、また乳脂肪以外は分房ごとの乳成分においてとくに差異がみられなかったことにより、臨床型乳房炎の存在しないことが認められた。分房間における脱脂乳中のP濃度の差異についてはさらに例数を追加し、とくに潜在性乳房炎¹¹⁾などとの関連で検討する必要があると考えられた。

乳汁の採取時期ごとの脱脂乳中P濃度は、10頭の平均値では朝の前搾り乳、混合乳および後搾り乳の間で有意の差は認められず、搾乳後の時間の経過に伴いしだいに低下する傾向が認められた。血漿中P濃度が5 ng/ml以上のA群と、5 ng/ml未満のB群で、乳汁の採取時期ごとの脱脂乳中P濃度を比較すると、両群において異なる変化がみられた。特にA群では混合乳の値に比べ前搾り乳は有意に低い値を示し、後搾り乳では差がみられず、また搾乳後の時間の経過に伴い脱脂乳中P濃度は著明に低下する傾向が認められた。

McCAUGHEYとGORDON¹³⁾は、発情期の牛(96例)と発情後21～22日の牛(58例)の前搾り乳、混合乳および後搾り乳の脱脂乳中のP濃度をRIA法で測定した結果、分房間および採取時期にいずれも有意の差がみられなかったと報告している。しかし、彼らの報告で発情後21～22日の混合乳の脱脂乳中P濃度の平均値は2.25 ng/mlと比較的低い値であった。

今回、A群で認められた脱脂乳中P濃度の変化は乳脂肪率の変化と同様の傾向を示した。全乳中のP濃度は前搾り乳では混合乳や後搾り乳と比べ有意に低い値を示し、混合乳と後搾り乳の間には差がみられないとの報告^{19,20)}があり、また谷中ら²³⁾およびGINTHERら⁴⁾は、搾乳終了後経時的に採取した全乳中のP濃度がほぼ直線的に低下し、搾乳終了直後の値に対して2時間後以降有意な低値を示したと報告している。これらの報告では、

いずれも全乳中の P 濃度が乳脂率の影響で変動することを示唆している。

乳汁中 P の大部分は脂肪に含まれる^{2,6)}ため、脱脂乳を用いる場合、脱脂操作が重要であるが、いずれの方法でも完全に脱脂することは困難¹²⁾であることから、乳脂率の影響は無視できないと考えられる。しかしながら、乳脂率は B 群でもほぼ同様の値で推移し、また P 濃度と乳脂率との間に有意の相関が認められなかったことなどから、脱脂乳中の P 濃度に対する乳脂率の影響は不明であった。乳汁の採取時期と脱脂乳中 P 濃度の関係については、乳成分の影響あるいはほかの要因を含め、さらに検討する必要があると考えられた。

血漿中と脱脂乳中の P 濃度を比較検討した結果、脱脂乳中の値は血漿中のそれと比べいずれの採取時期においても有意に低い値を示した。しかし搾乳後 6 時間以外は両者の間に有意の正の相関が認められた。著者らは臨床応用上最も採材しやすい時刻、すなわち朝の搾乳終了後約 6 時間を経過した午前 11 時から正午の間に採取した乳汁における脱脂乳中の P 濃度が血漿中と比べ著しく低い値を示し¹⁷⁾、両者の間に有意の相関がみられないことを認めている。また、岸本¹⁰⁾は乳汁の採取方法は不明であるが、脱脂乳中の P 測定による早期妊娠診断の精度が血漿を用いた場合よりやや劣ることを指摘している。ゆえに、脱脂乳中 P 測定の臨床応用上乳汁の採取方法は重要であり、搾乳後 6 時間以上経過した時点で採取した乳汁での P 測定には問題があると考えられた。

以上のことから、脱脂乳中の P 濃度は乳汁を採取する分房および採取時期により差異のあることが認められた。脱脂乳中の P 測定を目的とした乳汁の採取はその方法および時期を一定にすることが必要であり、混合乳を用いることが適当であると考えられた。

引用文献

- 1) COX, N. M., THOMPSON, F. N., and CULVER, D. H.: *J. Dairy Sci.*, 61, 1616~1621 (1978).
- 2) DARLING, J. A. B., LAING, A. H., and HARKNESS, R. A.: *J. Endocr.*, 62, 291~297 (1974).
- 3) FOULKES, J. A., COOKSON, A. D., and SAUER, M. J.: *Vet. Rec.*, 111, 302~303 (1982).
- 4) GINTHER, O. J., NUTI, L. C., GORCIA, M. C., and TYLER, W. J.: *J. Anim. Sci.*, 42, 155~159 (1976).
- 5) HEAP, R. B., GWYN, M., LAING, J. A., and WALTERS, D. E.: *J. Agr. Sci.*, 81, 151~157 (1973).
- 6) HEAP, R. B., HENVILLE, A., and LINZELL, J. L.: *J. Endocr.*, 66, 239~247 (1975).
- 7) HOFFMANN, B., GUNZLER, O., HAMBURGER, R., and SCHMIDT, W.: *Br. Vet. J.*, 132, 469~476 (1976).
- 8) INAUDI, P., BACIGALUPO, M., MONITOLA, C., et al.: *J. Reprod. Fert.*, 65, 265~273 (1982).
- 9) KARG, H., CLAUS, R., GUNZIER, O., et al.: Proc. 11th. *Int. Congr. on Diseases of Cattle*, Tel-Aviv, 889~894 (1981).
- 10) 岸本裕治, 加藤 寛, 三谷通博: 日獣会誌, 40, 161~164 (1987).
- 11) LAITINEN, J. T.: *Br. Vet. J.*, 142, 562~568 (1986).
- 12) LAITINEN, J., REMES, E., TENHUNEN, M., et al.: *Br. Vet. J.*, 141, 297~307 (1985).
- 13) McCaughey, W. J., and GORDON, F. J.: *Br. Vet. J.*, 135, 512~518 (1979).
- 14) NAKAO, T., SUGIHASHI, A., ISHIBASHI, Y., et al.: *Theriogenology*, 18, 267~274 (1982).
- 15) NAKAO, T., SUGIHASHI, A., SAGA, N., et al.: *Am. J. Vet. Res.*, 44, 888~890 (1983).
- 16) 及川 大, 中尾敏彦, 森好政晴, ほか: 家畜繁殖誌, 33, 64~72 (1987).
- 17) 岡田啓司, 佐藤 繁, 鈴木利行: 家畜診療, 320, 43~46 (1990).
- 18) PENNINGTON, J. A., SPAHR, S. L., and LODGE, J. R.: *J. Dairy Sci.*, 59, 1528~1531 (1976).
- 19) PENNINGTON, J. A., SPAHR, S. L., and LODGE, J. R.: *J. Dairy Sci.*, 64, 259~266 (1981).
- 20) POPE, G. S., MAJZLIK, I., BALL, P. J. H., and LEAVER, J. D.: *Br. Vet. J.*, 132, 497~506 (1976).
- 21) SINGH, A., and PUTHIYANDY, R.: *J. Reprod. Fert.*, 59, 89~93 (1980).
- 22) 高橋清治, 千葉正寛, 高橋英士, ほか: 日獣会誌, 40, 241~246 (1987).
- 23) 谷中 匡, 井田京子, 佐々木捷彦, ほか: 家畜繁殖誌, 32, 63~68 (1986).
- 24) 全国乳質改善協会編集発行: 生乳成分の変動要因と改善対策, 56~62 (1979).