

乳牛의 血清과 乳汁中の 호르몬水準에 의한 妊娠診斷에 관한 研究

金 相 根

忠南大學校 農科大學 獸醫學科

(1984. 2. 20 接受)

Studies on Pregnancy Diagnosis of Dairy Cows based on Hormone Concentrations in Blood Serum and Milk

Sang-keun Kim

Department of Veterinary Medicine, College of Agriculture, Chungnam National University

(Received February 20, 1984)

Abstract: The study was carried out to find out the changes of hormone levels in blood serum and milk of Holstein cows during the estrous cycle. The progesterone, estradiol-17 β from the blood serum and milk samples were assayed by radioimmunoassay methods.

The results of this study were summarized as follows;

1. The progesterone levels in blood serum during the estrous cycles began to decline rapidly at 2 days before estrus, decreased to 0.27 ± 0.18 ng/ml at on the day of estrus, and reached a peak mean level of 3.33 ± 0.47 ng/ml at 15 days after estrus.

2. The progesterone levels in milk during the estrous cycles began to decline rapidly at 2 days before estrus, decreased to 0.80 ± 0.18 ng/ml on the day of estrus, and increased a peak mean level of 3.80 ± 0.36 ng/ml at 15 days after estrus.

3. The estradiol-17 β levels in blood serum during the estrous cycles showed a peak mean level of 9.79 ± 1.72 pg/ml on the day of estrus, and decreased from 4.79 ± 1.82 pg/ml to 5.73 ± 0.96 pg/ml at luteal phase.

4. The estradiol-17 β levels in milk during the estrous cycles showed a peak mean level of 36.80 ± 2.04 pg/ml on the day of estrus, and decreased from 18.93 ± 0.84 pg/ml to 19.50 ± 1.12 pg/ml at luteal phase.

5. During 20 to 25 days after artificial insemination, the accuracy of pregnancy diagnosis from the blood serum progesterone levels were 87.5% for non pregnant cows (< 2.0 ng/ml), and 83.3% for pregnant cows (≥ 3.0 ng/ml). The accuracy of pregnancy diagnosis from the milk progesterone levels were 75.0% for non-pregnant cows (< 2.4 ng/ml), and 94.4% for pregnant cows (≥ 3.2 ng/ml).

緒 論

乳牛의 繁殖機能은 腦下垂體와 性腺에서 分泌되는 호르몬의 作用에 의하여 調節됨으로 正常乳牛의 體內호르몬水準을 측정하여 이것을 早期妊娠診斷과 繁殖障害牛

의 原因究明에 應用함은 매우 意義가 있다고 하겠다.

乳牛의 發情期間中 血清內的 progesterone水準에 대하여 Laing과 Heap⁷⁾은 發情後 9~10일에 3.82 ± 0.76 ng/ml로 가장 높았다고 하며, Plotka 등¹⁰⁾은 發情前 1~2日, 發情日, 發情後 14일에 各各 13.3, 10.1, 25.8

ng/ml였다고 하였다. 또한 estradiol-17 β 水準에 대하여 Mellin과 Erb¹³⁾은 個體間에 差가 많아 一貫性있게 量的 表示를 할 수 없었다고 하였으나, Wettemann 등^{14, 15)}은 發情 0.5日前에 9.7pg/ml로서 最高値에 達하였고 發情後 2~11日에는 平均 3.69pg/ml이었다고 하며, Smith 등¹⁶⁾은 發情前日에 11.0 \pm 1.3pg/ml로 最高水準을 나타냈다고 報告하였다.

發情期間中 乳汁內 progesterone水準은 Heap 등⁷⁾이 直接 radioimmunoassay法으로 測定하는 方法을 開發하였으며, 이들은 이 方法에 의해서 發情後 9~10日의 progesterone濃도가 3.82 \pm 0.76ng/ml로 最高水準을 나타냈다고 하였으며, Dobsen 등^{1, 2)}은 發情期에 progesterone농도는 3.0ng/ml이었으나 黃體期에는 10.0ng/ml로 매우 높았다고 하였다. 또한 乳汁內 estradiol-17 β 水準은 乳汁, 血清 및 尿中의 estrone과 estradiol-17 β 水準을 調査한 Monk 등⁸⁾의 報告와 發情日에는 높고 黃體期에는 17.5~19.2pg/ml水準이었다고 한鄭 등¹⁶⁾의 報告가 있을 따름이다. 한편 妊娠期間中 progesterone水準의 變化에 着眼하여 Robertson과 Sarda¹²⁾는 血清에서, Hoffmann 등⁶⁾과 Heap 등⁴⁾은 乳汁에서 progesterone水準을 측정하여 妊娠診斷이 可能함을 確認하였다.

이들의 研究結果를 綜合해 보면, 報告者間에 論旨가 一致되지 않은 點이 많을 뿐만 아니라, 호르몬水準의 差가 크며 또한 妊娠診斷의 實用化라는 面에서 血清 및 乳汁의 어느 水準에서 非妊娠 또는 妊娠으로 規定할 것인가 하는 問題가 따른다고 하겠다. 이에 이 試驗은 乳牛의 血清 및 乳汁內의 progesterone 및 estradiol-17 β 의 濃度變化를 究明함으로써 妊娠診斷에 應用할 수 있는 限界水準의 究明과 早期妊娠診斷 및 繁殖障害牛의 原因究明에 寄與코져 血清과 乳汁內의 progesterone과 estradiol-17 β 의 濃度를 radioimmunoassay法으로 測定하여 比較檢討하였기에 그 結果를 報告하는 바이다.

材料 및 方法

供試動物 : 體重 350~500kg의 Holstein乳牛 42頭를 供試하여 N.R.C. 飼養標準에 依據 配合된 飼料로서 飼育하였다.

試料의 採取 : 採血은 供試牛의 頸靜脈으로부터 10ml의 血을 採血하여 3,000rpm으로 遠心分離하여 血清을 分離시켜 分析할 때까지 -20°C에 冷凍 保存하였으며, 採乳는 搾乳 即時 搾乳罐의 中央部에서 20ml를 取하여 牛乳保存劑인 potassium dichromate 1錠이 들어있는 25ml의 試驗管에 넣고 完全히 溶解시킨後 密封하여 分析할 때까지 -20°C에 冷凍 保存하였다.

Hormone의 radioimmunoassay : 血清 및 乳汁中의 호르몬의 radioimmunoassay法은 Heap 등⁷⁾의 方法을 利用하였는데 호르몬의 測定方法은 Fig. 1과 같은 flow sheet의 過程에 따라 測定하였다.

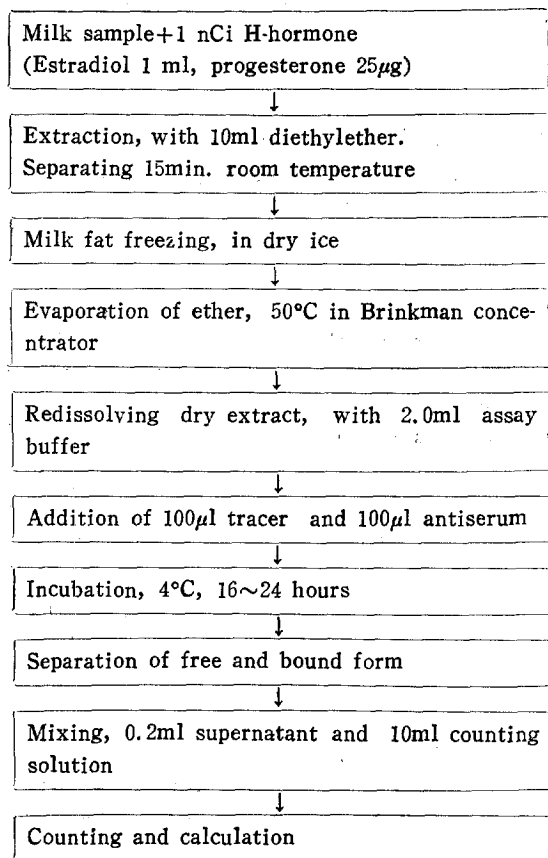


Fig. 1. Flow sheet for radioimmunoassay of sex steroid hormones.

結果 및 考察

發情週期の 血清內 progesterone水準 : 乳牛의 發情週期中 血清內 progesterone水準은 Table 1 및 Fig. 2에서 보는 바와 같이 發情週期の 長短에 따라 區分한 19~20日型, 21~23日型 및 24~26日型의 發情日의 水準은 各各 0.3 \pm 0.1ng/ml, 0.2 \pm 0.1ng/ml, 0.3 \pm 0.2ng/ml이었으며 그後 漸次 增加하여 發情後 15日에는 平均 3.33 \pm 0.47ng/ml로 最高値를 나타냈으나, 그後 減少하여 發情後 20~25日에는 0.80 \pm 0.16ng/ml水準이었다. 그러나 發情週期の 長短에 따른 progesterone水準의 有意한 變化는 認定되지 않았다.

이 試驗에서 黃體期에 progesterone의 最高値인 3.33 \pm 0.47ng/ml水準은 Laing과 Heap⁷⁾의 3.82 \pm 0.76ng/ml

보다는 比較的 낮은 水準이었다. 또한 最高値를 나타내는 時期에 관하여 Robertson¹¹⁾은 發情後 13~14日, Plotka 등¹⁰⁾은 14日이라고 報告하였는데 이들의 結果는 이 試驗結果와 大體로 類似한 結果로 생각되어진다.

發情週期の 乳汁內 progesterone水準 : Table 2와 Fig. 2에서 보는 바와 같이 發情週期の 長短에 따라 區分한 19~20日型, 21~23日型 및 24~26日型の 發情日의 乳汁內 progesterone水準은 各各 $0.6 \pm 0.2 \text{ ng/ml}$, $0.8 \pm 0.2 \text{ ng/ml}$, $0.9 \pm 0.4 \text{ ng/ml}$ 로서 가장 낮은 水準이었으며 그 後 漸次 增加하여 發情後 15日에는 各各 $3.9 \pm 0.3 \text{ ng/ml}$, $3.7 \pm 0.4 \text{ ng/ml}$, $3.8 \pm 0.6 \text{ ng/ml}$ 까지 增

Table 1. Progesterone levels (ng/ml) in blood serum during the estrous cycle

Days after estrus	No. of cows	Length of estrous cycle			Mean
		19~20	21~23	24~26	
0	5	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.3 ± 0.2	0.27 $\pm 0.18^*$
3	5	0.4 ± 0.2	0.5 ± 0.1	0.4 ± 0.2	0.43 ± 0.14
5	5	0.7 ± 0.4	0.9 ± 0.4	0.6 ± 0.1	0.73 ± 0.44
8	5	0.7 ± 0.3	0.7 ± 0.5	0.9 ± 0.2	0.77 ± 0.42
10	5	1.1 ± 0.3	0.9 ± 0.2	1.3 ± 0.4	1.10 ± 0.28
13	5	2.2 ± 0.3	2.0 ± 0.4	2.1 ± 0.3	2.10 ± 0.35
15	5	3.4 ± 0.4	3.5 ± 0.7	3.1 ± 0.4	3.33 ± 0.47
20~25	5	0.6 ± 0.2	0.8 ± 0.2	1.0 ± 0.3	0.80 ± 0.16

* : Mean \pm standard error.

Table 2. Progesterone levels (ng/ml) in milk during the estrous cycle

Days after estrus	No. of cows	Length of estrous cycle			Mean
		19~20	21~23	24~26	
0	5	0.7 ± 0.2	0.8 ± 0.2	0.9 ± 0.4	$0.80 \pm 0.18^*$
3	5	0.9 ± 0.1	1.2 ± 0.2	1.0 ± 0.1	1.03 ± 0.17
5	5	1.3 ± 0.2	1.3 ± 0.4	1.5 ± 0.4	1.37 ± 0.32
8	5	1.1 ± 0.2	1.4 ± 0.3	1.7 ± 0.2	1.40 ± 0.22
10	5	1.5 ± 0.3	1.7 ± 0.2	2.0 ± 0.4	1.73 ± 0.31
13	5	2.7 ± 0.4	2.6 ± 0.3	2.5 ± 0.2	3.60 ± 0.34
15	5	3.9 ± 0.3	3.7 ± 0.4	3.8 ± 0.6	3.80 ± 0.36
20~25	5	1.3 ± 0.2	1.1 ± 0.2	1.1 ± 0.3	1.17 ± 0.25

* : Mean \pm standard error.

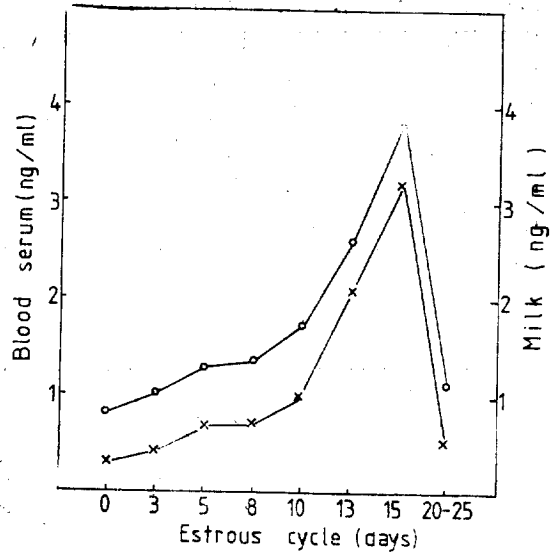


Fig. 2. Mean progesterone levels in blood serum (x—x) and milk (o—o) during the estrous cycle.

加하였으나, 發情後 20~25日에는 急激히 減少하여 平均 $1.17 \pm 0.25 \text{ ng/ml}$ 의 水準을 나타냈다.

이러한 傾向은 黃體期에서 3.82 ng/ml 라고 한 Laing과 Heap²⁾의 報告와는 매우 類似하였으나, 發情期와 黃體期에서 各各 3.0 ng/ml 와 10.0 ng/ml 라고 한 Dobson 등²⁾의 報告에 比하여는 매우 낮은 水準이었다. 또한 이 試驗에서 progesterone水準이 發情後 13~15日에 最高에 達했다가 그 後로는 急激히 減少하였는데 이는 發情後 13~15日에 最大에 達했던 黃體가 10~17日 傾에 退化를 始作하고 아울러 卵胞가 發育되면서 estrogen分泌가 增加되는데 基因한 結果라고 考察된다.

Table 3. Estradiol-17 β levels (pg/ml) in blood serum during the estrous cycle

Days after estrus	No. of cows	Length of estrous cycle			Mean
		19~20	21~23	24~26	
0	5	8.26 \pm 0.2	8.52 \pm 0.4	8.49 \pm 0.3	8.42 \pm 0.44*
3	5	3.98 \pm 0.4	3.81 \pm 0.3	4.10 \pm 0.4	3.96 \pm 0.72
5	5	3.91 \pm 1.2	3.62 \pm 0.8	3.97 \pm 0.7	3.83 \pm 0.91
8	5	3.89 \pm 1.2	3.56 \pm 1.8	3.65 \pm 1.4	3.67 \pm 1.42
10	5	4.56 \pm 1.4	4.72 \pm 1.8	5.09 \pm 1.9	4.79 \pm 1.82
13	5	5.24 \pm 1.4	5.46 \pm 1.6	4.69 \pm 1.2	5.13 \pm 1.41
15	5	5.69 \pm 1.2	5.94 \pm 0.8	5.57 \pm 1.0	5.73 \pm 0.96
20~25	5	9.74 \pm 1.4	8.42 \pm 1.7	11.15 \pm 1.9	9.79 \pm 1.72

* : Mean \pm standard error.

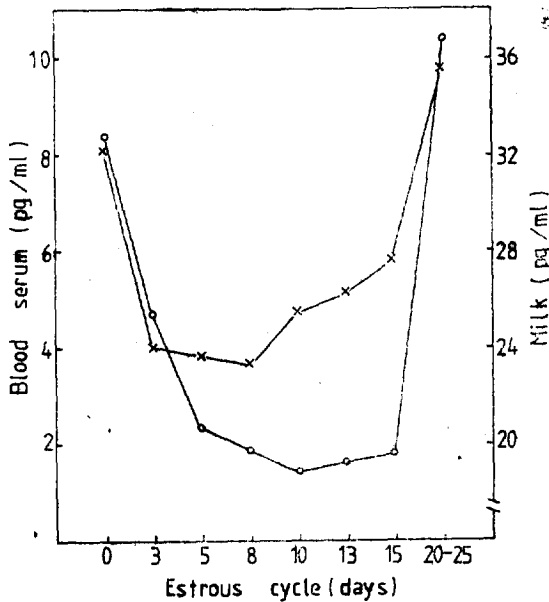


Fig. 3. Mean estradiol-17 β levels in blood serum (x—x) and milk (o—o) during the estrous cycle.

發情週期の血清内 estradiol-17 β 水準 : 發情期間中の血清内 estradiol-17 β 水準은 Table 3과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 發情週期の長短에 따라 區分한 19~20日型, 21~23日型 및 24~26日型の 發情日의水準은 各各 8.26 \pm 0.2pg/ml, 8.52 \pm 0.4pg/ml, 8.49 \pm 0.3pg/ml이었으며, 그後 減少하기 始作하여 發情後 8日까지 繼續되었으며 發情後 10日부터 약간 增加하기 始作하여 發情後 20~25日은 9.79 \pm 1.72pg/ml로서 最高水準을 나타냈다.

이러한 結果는 Wettemann 등¹⁴⁾과 Smith 등¹³⁾이 發情 0.5日前과 發情前日에 各各 9.7pg/ml와 11.0 \pm 1.3 pg/ml로 最高水準을 나타냈었다고 하는 報告와 거의 一致하는 傾向이었다.

發情週期の乳汁内 estradiol-17 β 水準 : Table 4와 Fig. 3에서 보는 바와 같이 發情週期の長短에 따라 區分한 19~20日型, 21~23日型 및 24~26日型の 發情日의 乳汁内 estradiol-17 β 의水準은 各各 38.4 \pm 4.2pg/ml, 32.2 \pm 4.8pg/ml, 32.7 \pm 6.2pg/ml이었으며 平均水準은 32.77 \pm 1.84pg/ml로서 매우 높은水準이었다. 그後로 부터 發情後 15日까지 漸次 減少하였고 다음 發情直前

Table 4. Estradiol-17 β levels (pg/ml) in milk during the estrous cycle

Days after estrus	No. of cows	Length of estrous cycle			Mean
		19~20	21~23	24~26	
0	5	33.4 \pm 4.2	32.2 \pm 4.8	32.7 \pm 6.2	32.77 \pm 1.84*
3	5	25.2 \pm 4.4	24.7 \pm 2.2	25.4 \pm 2.4	25.43 \pm 1.68
5	5	22.4 \pm 3.8	19.4 \pm 0.8	20.1 \pm 1.2	20.67 \pm 2.24
8	5	20.6 \pm 1.6	19.0 \pm 1.4	20.1 \pm 2.2	19.90 \pm 1.02
10	5	19.8 \pm 2.1	18.2 \pm 2.2	18.8 \pm 4.1	18.93 \pm 0.84
13	5	19.4 \pm 1.4	18.6 \pm 2.3	19.2 \pm 1.8	19.07 \pm 0.96
15	5	19.5 \pm 1.0	18.8 \pm 2.8	20.2 \pm 2.3	19.50 \pm 1.12
20~25	5	38.8 \pm 0.9	34.8 \pm 3.9	36.8 \pm 4.7	36.80 \pm 2.04

* : Mean \pm standard error.

Table 5. Correlation of progesterone levels in blood and milk, and rectal palpation tested in 42 cows of pregnant and non pregnant

Result of rectal palpation	Blood serum				Milk				
	Limit level of pregnancy test(ng/ml)*				Limit level of pregnancy test(ng/ml)*				
	<2.0	2.0-2.9	≥3.0	Total	<2.4	2.4-3.1	≥3.2	Total	
	Non-pregnant	Doubtful	Pregnant		Non-pregnant	Doubtful	Pregnant		
Pregnant	No. of cows	2	1	21	24	2	4	18	24
	%	(8.3) #	(4.2)	(87.5)	(100)	(8.3)	(16.7)	(79.2)	(100)
Non-pregnant	No. of cows	15	.	3	18	17	.	1	18
	%	(83.3)	.	(16.7)	(100)	(94.4)	.	(5.6)	(100)
Total	No. of cows	17	1	24	42	19	4	19	42

: Percentage of agreement between level and rectal palpation result.

* : P<0.05

인 20~25일의 平均水準은 36.80±2.04pg/ml로 急増하였다. 한편 發情週期の 長短에 따른 estradiol-17β水準의 差는 있었으나 有意한 差는 認定되지 않았다.

이러한 結果는 發情週期中의 estradiol-17β水準은 發情前日에서 發情當日사이에 最高値를 나타낸다는 鄭 등¹⁶⁾의 報告와 매우 類似한 水準이었다.

血清과 乳汁內의 progesterone水準에 의한 妊娠診斷: 妊娠 및 非妊娠牛의 progesterone水準을 測定하여 妊娠診斷에 應用코져 授精後 60~90日에 直腸檢査에 의해 確認된 妊娠牛 24頭와 非妊娠牛 18頭에 대하여 調査한 妊娠牛와 非妊娠牛의 血清과 乳汁內의 平均水準은 各各 3.8±0.6ng/ml, 1.6±0.8ng/ml, 4.2±0.7ng/ml, 1.8±1.2ng/ml로서 이들간에는 큰 差異가 있었다. 血清과 乳汁內 progesterone水準에 따라 妊娠與否를 決定하는 限界水準에 있어 妊娠牛는 各各 3.0ng/ml 以上, 3.2ng/mg 以上, 非妊娠牛는 各各 2.0ng/ml 以下, 2.4ng/ml 以下 水準이었다. 이때 血清과 乳汁內 progesterone水準에 根據한 妊娠診斷結果를 直腸檢査結果와 比較하였으며, 供試牛 42頭에 대한 妊娠與否를 妊娠牛와 非妊娠牛의 限界水準과 比較分類한 바, 그 結果는 Table 5와 같다. 血清과 乳汁內 progesterone水準을 利用한 妊娠診斷成績은 妊娠牛와 非妊娠牛에 있어 各各 87.5%와 83.3%, 75.0%와 94.4%의 正確度를 얻을 수 있었다.

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 됨으로 體內 progesterone水準이 낮아지므로 이러한 增減變化의 原理를 利用하여 妊娠與否를 診斷하려는 研究가 많이 遂行되고 있는데 이 試驗 結果는 Heap 등^{3,4)}과 鄭

등¹⁶⁾의 報告와 거의 類似한 成績이었다.

結 論

乳牛의 發情週期에 따른 血清과 乳汁內 progesterone과 estradiol-17β水準變化와 progesterone水準에 의한 妊娠診斷 與否를 究明하고자 progesterone과 estradiol-17β水準을 radioimmunoassay法으로 測定하여 比較檢討하였던 바 그 結果는 다음과 같다.

1. 發情週期中의 血清內 progesterone水準은 發情 2日前에 急減하여 發情日에는 0.27±0.18ng/ml이었으며 發情後 15日에는 3.33±0.47ng/ml로 最高水準이었다.

2. 發情週期中의 乳汁內 progesterone水準 역시 發情 2日前에 急減하여 發情日에는 0.80±0.18ng/ml이었으며 그 後 漸次 增加하여 發情後 15日에는 3.80±0.36ng/ml로 最高水準이었다.

3. 發情週期中의 血清內 estradiol-17β水準은 發情日에 9.79±1.72pg/ml로서 最高値를 나타냈으며, 黃體期에는 4.79±1.82~5.73±0.96pg/ml로서 減少된 水準이었다.

4. 發情週期中의 乳汁內 estradiol-17β水準은 發情日에 36.80±2.04pg/ml로서 最高値를 나타냈으며, 黃體期에는 18.93±0.84~19.50±1.12pg/ml로서 低下된 水準이었다.

5. 授精後 20~25日의 血清과 乳汁內 progesterone水準에 의한 妊娠診斷에서 各各 2.0ng/ml, 2.4ng/ml 以下를 非妊娠牛로 3.0ng/ml, 3.2ng/ml 以上을 妊娠牛로 했을 때의 妊娠診斷成績은 各各 87.5%와 83.3%, 94.4%와 75.0%의 正確度를 얻을 수 있었다.

參 考 文 獻

1. Dobson, H., Hopkinson, C. and Ward, W.R.: Progesterone, 17- β oestradiol and luteinizing hormone in bovine peripheral plasma in relation to ovulation. *J. Endocrinol.* (1972) 55 : 15.
2. Dobsen, H., Midmer, S.E. and Fitzpatrick, R.J.: Relationship between progesterone concentrations in milk and plasma during the bovine oestrous cycle. *Vet. Rec.* (1975) 96 : 222.
3. Heap, R.B., Gwyn, M., Laing, J.A. and Walters, D.E.: Pregnancy diagnosis in cows: Change in milk progesterone concentration during the oestrous cycle and pregnancy measured by a rapid radioimmunity. *J. Agr. Sci.* (1973) 81 : 151.
4. Heap, R.B., Holdworth, R.J., Gadsby, T.E., Laing, J.A. and Walters, D.E.: Pregnancy diagnosis in the cow from milk progesterone concentration. *A.B.A.* (1976) 45(1) : 49.
5. Hoffmann, B., Günzler, O., Hamburger, R. and Schmidt, W.: Milk progesterone as a parameter for fertility control in cattle: Methodological approaches and present status of application in Germany. *Br. Vet. J.* (1976) 132 : 469~476.
6. Hoffmann, B., Hamburger, R., Günzler, O., Korndorfer, L. and Lohoff, H.: Determination of progesterone in milk applied for pregnancy diagnosis in the cow. *Theriogenology* (1974) 2 : 21.
7. Laing, J.A. and Heap, R.B.: The concentration of progesterone in the milk of cows during the reproductive cycle. *Br. Vet. J.* (1971) 127 : 19.
8. Mellin, T.N. and Erb, R.E.: Estrogen in the bovine, A review. *J. Dairy Sci.* (1965) 48 : 687.
9. Monk, E.L., Erb, R.E. and Mollett, T.A.: Relationship between immunoreactive estrone and estradiol in milk, blood and urine of dairy cows. *J. of Dairy Sci.* (1967) 50 : 1158.
10. Plotka, E.D., Erb, R.E., Callaham, C.J. and Gomes, W.R.: Levels of progesterone in peripheral blood plasma during the estrous cycle of the bovine. *J. Dairy Sci.* (1967) 50 : 1158.
11. Robertson, H.A.: Sequential changes in plasma progesterone in the cow during the estrous cycle, pregnancy at parturition and postpartum. *Can. J. Ani. Sci.* (1972) 52 : 645~658.
12. Robertson, H.A. and Sarda, I.R.: A very early pregnancy test for mammals: its application to the cow, ewe and sow. *J. Endocrinol.* (1971) 49 : 407.
13. Smith, J.F., Fairclough, R.J., Payne, E. and Pertson, L.A.: Plasma hormone levels in the cow. (I). Changes in progesterone and oestrogen during the normal estrous cycle. *N.Z.J. Agr. Res.* (1975) 18 : 123.
14. Wettemann, R.P., Hafs, H.D., Edgerton, L. A. and Swanson, L.V.: Estradiol-17 β and progesterone in blood serum during the bovine estrous cycle. *J. Anim. Sci.* (1972) 34(6) : 1020~1024.
15. Wettemann, R.P. and Hafs, H.D. : LH, prolactin, estradiol and progesterone in bovine blood serum during early pregnancy. *J. Anim. Sci.* (1973) 36(1) : 51~56.
16. 鄭英彩, 金昌根 : 소의 多頭分娩에 관한 研究. II. 牛乳의 Hormone分析法에 의한 소의 早期妊娠診斷法에 관한 研究. *韓畜誌* (1980) 22(1) : 7~15.