

ELISA에 의한 국내 재래종 산양의 정상상태에서의 혈중 cortisol 농도

曹圭完 · 許周衡 · 李恩錫 · 姜正夫
慶尙大學校 獸醫科大學
(1993년 8월 29일 접수)

Serum cortisol concentrations on the normal condition in Korean native goats by ELISA

Kyu-wan Cho, Ju-hyeong Hur, Eun-sug Lee, Chung-boo Kang
College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University
(Received Aug 29, 1993)

Abstract : This study was performed to examine the changes of serum cortisol concentrations on the normal conditions in Korean native goats by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA).

The Korean native goats were 4 to 30 months old and weighted 6.0 to 28 kg. The goats were allowed ad libitum access to water and food.

To minimize the stress with handling and blood sampling, animals were adapted for 2 weeks before the experiment. After adaptation, intravenous catheter was inserted left intact a jugular vein of 6 goats and blood samples were done 2~3 days later. Experimental animals were divided into 2 groups which was non-catheterized and catheterized group in order to examine the effect for changes of serum concentration and circadian rhythm of cortisol.

The results were obtained as follows :

The sensitivity of serum cortisol concentration was 20 pg/ml. The intra-assay and inter-assay coefficient of variation were below 2.5% and 5%, respectively.

Serum concentration of cortisol was more higher in non-catheterized group(32.84 ± 16.78 ng/ml) than catheterized group(23.20 ± 10.29 ng/ml). The difference according to months old in serum concentration of cortisol was the more higher on 4~6 than 7~12 and lowest over 12 months old.

A circadian rhythm in the serum concentration of cortisol in Korean native goats was not found significantly with 2 hours sampling intervals.

Key words : cortisol, goat, ELISA, circadian rhythm.

緒 論

부신피질 자극호르몬(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)은 부신피질(adrenal cortex)에 작용해서 주로 cortisol의 분비를 촉진시키고 cortisol은 뇌하수체 전엽으로부터 ACTH 분비를 억제시켜 항상성을 유지하고 있다. ACTH의 분비는 시상하부에 존재하는 ACTH 중추에

의해 조절되고² 있는데 여기에는 corticotropin releasing factor(CRF)가 관여하고 있는 것으로 알려져 있다.

Cortisol은 부신피질의 속상대에서 분비되는 glucocorticoids로 여기에는 cortisol, corticosterone 및 cortisone이 있으나 대부분의 포유동물은 cortisol이 주가 되나, 설치류와 조류는 corticosterone이 거의 대부분이며, 반추류는 cortisol과 corticosterone의 농도가 비슷한 것으로 알

려져 있다.³

혈중 cortisol 농도는 ACTH 자극⁴에 의해 혈중에 방출되는 양과 cortisol의 대사속도에 의해 결정되기 때문에 대사속도에 큰 변화가 없는 한 ACTH 분비 양상에 따라 일내 변동을 나타내게 되어 있다. 사람에서는 circadian rhythm이 알려져 있는데 자정과 아침에 가장 높고 정오에 낮고, 고양이에서는 저녁에 가장 높고 아침에 가장 낮음이 보고되어⁵ 있다. 대부분의 동물은 일일증에서 짧은 시간내 약간의 변동을 나타내어 말, 돼지, 양, 닭, 비둘기는 circadian rhythm이 있는 것으로 알려져 있다. Circadian rhythm의 원인에 대해서는 ACTH 변화 및 빛에 의해서 생기거나 또는 활동(운동, 반추, 정서)의 관련설 등^{6,7}이 있다. 또한 우리에게 가두거나 착유, 운동, 수술, 마취, 발열, 정서불안, 사료급여의 예고 등과 같은 stress에 의해서도 증가함이 보고되어 있다.⁸

Cortisol은 혈당당생 작용의 촉진, insulin에 대한 길항작용의 단백질 대사의 촉진, 지방저장의 감소는 물론 순환 임파구, 단핵구, 호산구는 감소시키고 반면 호중구는 증가시키는 물론 prostaglandin, leukotrienes, kinins, serotonin, histamine과 같은 염증반응 매개물과 여러 종류의 lymphokines 같은 면역매개물을 조절하여 국소 염증반응을 감소시키는 항염증효과와 antiallergic 효과가 있다. 또한 반추류 등에서는 임신말기 태반에서 estrogen 합성증가^{9,10}와 분만을 유발하는^{11,12}, 등 아주 다양한 기능이 있음이 밝혀져 이의 기초연구 및 임상활용을 위하여 분석법의 개발에 관심이 집중되고 있다.

혈장 또는 혈청의 cortisol 농도의 측정은 초기에서는 황색반응에 의한 방법 등이 주로 실시되어 초기의 fluorimetry¹³에서는 sulfuric acid에 의한 전처리는 물론 dichloromethane 등의 추출에 의해 sample 중에서 이들 물질의 완전 제거가 어렵고 더우기 prednisolone 등과 같은 cortisol 이와의 다른 steroid 홀몬의 간섭작용으로 측정 감도가 낮아 어려움이 있었다. Gore 등¹⁴의 competitive protein binding (CPB) assay에서는 앞서의 fluorimetry 보다는 조작이 간편하면서도 용이한 점은 있으나 cortisol의 결합 globulin에 의한 영향과 prednisolone 및 다른 steroides 등에 의한 간섭작용이 커 측정에 어려움이 많았다. 이후 liquid chromatography¹⁵에 의한 방법 및 high performance liquid chromatography(HPLC)¹⁶에 의한 방법이 실시되었으나 측정에 많은 시간이 소요되고 특수한 기자제의 설치가 있어야 하는 등의 어려움이 있어 radioimmunoassay(RIA)^{4,16~19,20}에 의한 측정이 거의 주류를 이루고 있으나 RIA에서도 radioisotope를 사용하여야 하는 특수성 때문에 인체에 오염가능성, 폐기물 처

리의 어려움, radioisotope의 반감기가 너무 길거나 짧은 점 등은 물론이고 최근에는 환경규제에 의한 제한사용 등의 어려움이 있어 radioisotope 대신 효소를 사용하는 이른바 효소면역측정법(enzyme immunoassays, EIA)²¹이 개발되었으나 초기의 EIA에서는 반응시간이 길고 원심분리 등의 절차가 필요하여 측정감도가 낮은 점이 지적되고 있다. Lewis^{22,23}는 cortisol의 측정에 enzyme-linked immunosorbent assays(ELISA)를 처음 적용하여 RIA와 비교하였는데 이의 결과 RIA 보다 측정감도 및 재현성 등에서 조금도 손색이 없음이 입증되어 이의 활용은 각종 질병의 진단 및 예후판정에 지표가 될 것으로 판단되어 일차적으로 재래산양의 정상상태에서 혈중 cortisol 농도변화 및 circadian rhythm 변동을 파악코저 실시하였다.

材料 및 方法

供試動物: 본 실험에 사용한 재래종 산양은 농가에서 사육중인 것으로 임신시키지 않은 임상적으로 건강한 재래종 산양 암컷만으로 공시하여 발정증상이 없는 것만 사용하였다. 월령은 4~30개월이고, 체중은 6.0~28kg이며 사료 및 음수는 자유로이 섭취할 수 있도록 하였고, 보정 및 채혈을 용이하게 할 수 있도록 부대설비를 실험 2주전에 갖추어 적응시켜 실시하였다. 실험 그룹은 채혈방법에 따른 혈청 cortisol 농도 및 circadian rhythm을 보려고 경정맥내 catheter 無裝着한 그룹과 catheter 裝着한 그룹으로 나누어 실시하였다.

採血 및 血清分離: 채혈방법에 따른 cortisol 농도 및 circadian rhythms을 파악하기 위하여 경정맥내 catheter 장착하지 않은 그룹을 연령별로 나누어 후 무작위 추출법으로 경정맥에서 12:00 時에 21 G, needle을 이용하여 혈액을 채혈하였으며 연속된 채혈시에 needle에 의한 stress를 배제하려고 30시간 간격으로 18:00, 24:00, 06:00에 혈액을 1회에 3ml 채혈하였다.²⁴ 채혈시에는 다른 개체가 볼 수 없도록 하였으며 채혈한 개체는 채혈하지 않은 개체가 흥분하지 않게 채혈후에 보이지 않는 장소에 격리시켰다. 한마리 채혈에 소요되는 시간은 2분 이하로 하였으며 한번 채혈시도에 실패한 개체는 다른 개체로 대체하여 실시하였다.

경정맥내 catheter 장착한 그룹은 catheter 장착에 따른 stress가 cortisol에 미치는 영향을 최소화하고 채혈을 용이하게 하려고 2~3일전에 연령별로 나누어서 intravenous catheter를 6두(4~24 개월령, 체중 7~18kg)에 장착하였으며 일내 변동을 측정하기 위해서 2시간 간격으로 24시간동안 1.5~2ml씩 채혈하였다.

혈청분리는 채혈한 혈액을 실온에서 30분간 응고시킨

후 1500rpm으로 15분간 원심분리하여 혈청을 분리한 다음, 분리된 혈청은 cortisol 측정시까지 -25°C에 보존하였다.

경정맥내 catheter는 Becton Dickinson社의 20G, 21N를 사용하였고, 항응고제로는 heparin(1000 IU/ml, 中外製藥)을 사용하였다.

Coating 및 assay buffer, 세척액과 효소 기질액, 반응정지액, enzyme conjugate 및 cortisol 표준액의 제조는姜 등²⁵의 방법에 의거하여 조제하였다.

Cortisol 항체는 cortisol-3-carboxymethyloxime(CMO):BSA를 항원으로 하여 토끼에 접종하여 획득한 것으로 Tsutsui(일본 수의 축산대)교수로 부터 제공받아 사용하였다.

Cortisol의 측정은姜 등²⁵의 ELISA에 의한 progesterone 분석방법을 시료 준비과정만을 약간 달리하여 사용하였다.

結 果

변동계수: Cortisol 표준용액 0.02~5.0ng/ml을 사용하여 측정한 결과 흡광도치(O.D)와 결합율(% bound)은 0.02ng/ml에서는 0.99±0.049, 97.2±0.9, 5ng/ml에서는 0.16±0.0045, 19.9±0.9이었으며 측정내 변동계수(intra-assay coefficient of variation)는 2.5%이하, 측정간 변동계수(inter-assay coefficient of variation)는 5%이하이었다(Fig 1, Table 1).

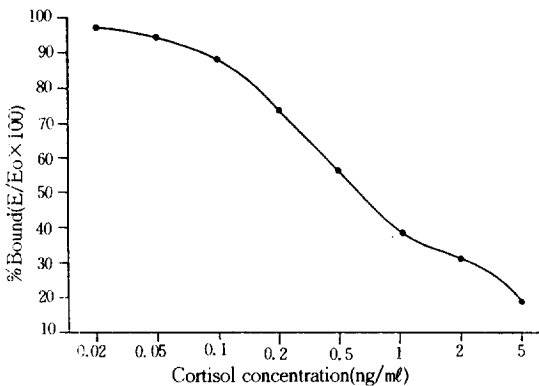


Fig 1. Standard curve in cortisol standard solution.

시료측정에서 측정내 변동계수는 20ng/ml(n=9)에서는 1.5%, 32ng/ml(n=12)에서는 2.5% 이하, 70ng/ml(n=5)에서는 2.5% 이하 이었고, 측정간 변동계수는 5%이하(평균 2.3%, n=12)이었다.

측정감도: 혈청 cortisol의 측정감도는 20pg/ml 이었다.

경정맥내 catheter를装着하지 않은 산양에서 채혈시의 월령과 시간별에 따른 혈청 cortisol 농도: 경정맥내 catheter를 장착하지 않고 채혈한 산양의 혈청에서 cortisol의 평균은 32.84±16.78ng/ml, 6개월령 이하에서는 39.33±23.55ng/ml, 7~12개월령에서는 33.83±9.81ng/ml, 12개월령 이상에서는 25.8±13.02ng/ml이었다. 채혈시간별 측정치는 06:00에는 39.33±21.76 ng/ml, 12:00에는 35.22±9.7 ng/ml, 18:00에서는 21.37±15.81ng/ml, 24:00에서는 29.25±5.04 ng/ml이었다. 월령에 있어서는 월령이 적은 것이 cortisol치가 높았고 하루중에서는 06:00에서 높게 나타났다(Table 2).

경정맥시 catheter를装着한 산양에서 월령과 시간별에 따른 혈청 cortisol 농도와 circadian rhythm: 경정맥내 catheter를 장착하여 채혈한 혈청에서 cortisol의 측정치는 연령에 따라서는 5개월령에서는 23.20±10.29ng/ml, 8개월령에서는 19.83±11.45 ng/ml, 15개월령에서는 19.7±8.48 ng/ml으로 5개월령이 높았다. 하루중의 cortisol 농도 변화를 보려고 2시간 간격으로 채혈한 경우, cortisol치의 평균은 06:00에는 23.3±8.12 ng/ml, 12:00에서는 20.8±9.9 ng/ml, 18:00에서는 28.7±11.8 ng/ml, 24:00에서는 20.2±7.1 ng/ml으로 시간별에 있어서는 16:00, 18:00에서 높았고, 08:00, 10:00에서 낮게 나타났다. 전체 측정치의 평균은 20.92±10.3 ng/ml 수준이었다.

본 실험에서 사용한 4~30개월령의 산양에서 혈청 cortisol을 2시간 간격으로 채혈하여 circadian rhythm의 발현여부에 대한 분석을 실시한 결과 circadian rhythm은 명확하지 않았다(Table 3).

考 察

ELISA로 혈청중의 cortisol 농도를 측정한 결과 측정내 변동계수 2.5% 이하, 측정간 변동계수는 5%이하였고, 측정감도는 20 pg/ml였다. 이는 Ford 등²¹이 EIA로 측정시 측정내 변동계수는 6.2~9%, 측정간 변동계수는 8.4~4.9%, Fulkerson²⁶, Jephcott²⁷, Roland 등²⁸이 RIA로 측정시 측정내 변동계수와 측정간 변동계수는 각각 2.59%와 9.0%, 7.0%와 13%, 5.5%와 5.3%인데 비하여 변동계수는 낮게 나타났다. Lewis²³는 사람의 혈장에서 ELISA를 사용한 경우에 측정내 변동계수는 144,251,587 nmol/l 일 때 9.3, 10.1, 10.2%이고 측정간 변동계수 10.4% 넘지 않았다고한 것에 비하면 매우 낮았으며 Cooper 등¹⁶이 사람과 가축의 타액에서 ELISA로 cortisol 측정시에 측정간 변동계수는 1%정도이고 측정내 변동계수는 5%이었다는 결과와 비슷하였다.

Lewis 등²³은 1984년 사람의 혈장에서 ELISA를 처음

Table 1. Bound percentage for standard solution by ELISA

Plate	Concentration of standard cortisol(ng/ml)							
	0.02	0.05	0.1	0.2	0.5	1	2	5
1	97.80	94.27	90.78	72.09	57.01	38.07	32.50	19.21
2	95.99	94.73	88.52	74.29	56.82	40.26	33.27	21.24
3	96.87	93.90	89.68	73.32	56.32	37.83	32.95	20.25
4	98.23	92.30	89.13	72.83	55.92	38.22	31.26	18.93
mean±SD	97.2±0.9	93.8±0.9	89.5±0.8	73.3±0.6	56.5±0.4	38.6±1.0	32.5±0.8	19.9±0.9
C.V.(%)	0.9	1.0	0.9	0.8	0.7	2.5	2.4	4.6

% bound(E/E₀×100), E : absorbance reading of sample
E₀ : absorbance reading of zero sample

C.V. : coefficient of variation

Table 2. Changes of serum cortisol concentration(ng/ml) from group which was non-catheterized goats

Hour	06 : 00	12 : 00	18 : 00	24 : 00	Remark
4~6 Mon.	90	16	51	28	39.3±23.5
	55	49	8	34	
		23			
7~12 Mon.	58	36	19	32	33.8±9.8
		33	39	23	
		39	28	24	
Over 12 Mon.	31	40	2	35	25.8±13.2
	37	36	16	35	
	25	45	8	23	
Mean±SD	39.3±21.7	35.2±9.7	21.4±15.8	29.2±5.0	32.8±16.8

Table 3. Changes of serum cortisol concentration and circadian rhythm from group which was intravenous catheterized goats

Hour	24 : 00	02 : 00	04 : 00	06 : 00	08 : 00	10 : 00	12 : 00	14 : 00	16 : 00	18 : 00	20 : 00	22 : 00	Remark
5 Month	20	12	10	30	5	11	8	20	19	21	23	36	17.9±8.8
	22	29	26	32	39	16	22	25	35	48	17	31	28.5±8.9
8 Month	20	10	13	9	18	15	8	15	40	26	15	5	16.2±9.0
	9	11	20	26	11	11	35	25	33	34	51	16	23.5±12.4
15 Month	33	27	20	26.5	11	24	28	30	7	20	6.5	9.5	20.2±9.0
	17	12	14	16	12	19	24	31	38	19	18	10.5	19.2±7.8
Mean	20.2	16.8	17.2	23.3	16	16	20.8	24.3	28.7	28	21.8	18	20.92
±SD	±7.1	±7.9	±5.4	±8.1	±11	±4.5	±9.9	±5.5	±12	±10	±14	±12	±10.28

적용하여 RIA와 ELISA로 cortisol을 측정 비교한 결과 측정결과는 비슷하였으며 RIA보다 ELISA가 측정감도나 특이성 면에서 우수하고 비용이 저렴하며 방사성 동위원소를 다루지 않아도 되는 잇점이 있다고 보고한 바 있다.

Thomas 등²⁰이 개에서 나이와 성별, 품종에 따른 비교에 의하면 체구가 큰 품종보다는 작은 품종이 높았고, 포유중인 어린개는 다른 연령에 비하여 낮았으나 성별에는 차이가 없음을, Tagawa 등²⁹은 개에서 연령에 대한 변동은 2~3개월령, 8~10년령, 2년령 순으로 혈중 cortisol 농도가 높았고, 성별에 따른 차이는 없었다고 보고한 바 있다. 본 실험에서 연령에 따른 cortisol 농도는 catheter 장착에 관계없이 4~6개월령에서 가장 높

았고 다음이 7~12개월령, 12개월령 이상에서 가장 낮게 나타났다. 이러한 결과로 보아 산양에서 연령에 따른 농도 차이가 있음이 추측된다.

Leferbvre 등²⁴은 소에서 보정과 catheter 장착이 cortisol 농도를 증가시킴을, Nanda³⁰, Tagawa 등²⁹은 catheter 장착이나 채혈시에 보정이나 주사바늘의 삽입에 의한 stress가 cortisol의 농도를 증가시킨다고 하였다. Robert 등³¹은 주사에 의한 cortisol 변화를 보려고 새끼 돼지에 생리식염수를 피하주사한 결과 10분 이내에 주사전의 5.8±2.7 ng/ml에서 22.8±2.7 ng/ml로 급격히 증가한 후 20분에서는 17.6±2.7 ng/ml, 30분에서는 6.5±2.7 ng/ml로 감소하였다고 하였으며 채혈을 위한 catheter 장착은 24시간 전에 실시하여 동물을 적응시켜야만 장

착에 따른 영향이 없어짐을 보고하였다. 본 실험에서 catheter를 장착하지 않은 그룹에서는 혈청 cortisol 농도가 32.8 ± 16.8 ng/ml로, 장착한 그룹에서의 20.92 ± 10.28 ng/ml보다 높게 나타났다. 이러한 결과는 catheter를 장착하지 않은 그룹에서 보정과 채혈에서 오는 stress를 줄이기 위해 부대설비를 갖추고 연속된 채혈시에 needle에 의한 stress를 배제하기 위해 30시간 간격으로 채혈하였지만 catheter를 장착한 그룹에 비하여 채혈에 따른 stress를 많이 받아서 높게 나타난 것으로 생각된다.

본 실험에서 cortisol의 circadian rhythm은 명확하지 않았다. Weitzman⁵과 De Lacerda 등⁶은 사람에서 circadian rhythm은 정오에 가장 낮고 아침과 저녁에 가장 높음을, Michael 등¹⁹은 사람에서 24:00~04:00 시에 $50 \sim 54$ ng/ml에 가장 낮았으며 06:00~09:00에서 $163 \sim 253$ ng/ml로 가장 높았고, 12:00에 108 ng/ml로 감소되고 16:00까지 약간 증가한 후 점차 감소하는 경향을 나타내었다고 하였다.

Hudson 등³²은 소에서는 rhythm이 없다고 하였으나 Macadam³³, Wagner 등³⁴은 있다고 하는 상반된 결과로 명확하지 않다. Bassett 등³⁵은 양에서는 주기가 없다고 하였으나 Fulkerson²⁶, McNatty 등³⁶은 양에서 30분간격으로 채혈한 결과 아침에 현저하게 높았고 또한 규칙적으로 증감하는 ultradian rhythm(0.6 cycles/h)이 있어 $20 \sim 40$ ng/ml의 진폭이 있음을, Fulkerson³⁷은 양에서 경정맥 catheter를 통하여 10분 간격으로 채혈하여 측정해 본 결과 밤이 되면서 높아지기 시작하여 한밤중에 가장 높았고(≥ 100 ng/ml) 이후 점차 낮아지기 시작하여 정오에 가장 낮았으며(≤ 3 ng/ml), ultradian rhythm은 0.8~1.2 cycles/h로 반복된다고 하였다. Minton 등⁷은 돼지에서 circadian rhythm은 18:00시에 낮고 밤이 되면서 증가하여 06:00시가 가장 높았으며 ACTH rhythm이 없어도 빛에 의해서 조절된다고도 하였다.

본 실험에서 circadian rhythm이 Fulkerson이 실험한 양에서와 같이 명확하지 않은 것은 양에서는 채혈간격이 30분간격 이하일 때에 circadian rhythm이 나타난 것으로 보아 본 실험에서는 채혈간격이 길어서 잘 나타나지 않았던 것으로 판단된다.

結 論

ELISA를 이용하여 채래산양에서 정상상태의 혈중 cortisol 농도의 변화를 측정하였다. 실험동물의 연령은 4~30개월령이고 체중은 6~28kg이며 먹이와 물은 자유롭게 급식하게 하였다. 보정과 채혈에서 생기는 stress를 줄이기 위해서 보정과 채혈이 용이하게 부대설비를 갖추어서 2주일동안 적용시켜 사용하였다. 산양 6마리

는 경정맥내 catheter를 실험 2~3일전에 裝着하였다.

실험동물은 혈액채취 방법에 따른 cortisol 농도와 circadian rhythm을 보려고 경정맥내 catheter 裝着하지 않은 그룹과 將着한 그룹으로 나누어 cortisol 농도를 측정하였다.

ELISA에 의한 혈청 cortisol의 측정감도는 20 pg/ml이었다. 측정내 변동계수는 2.5%이하, 측정간 변동계수는 5% 이하이었다.

경정맥내에 catheter를 裝着하지 않은 그룹의 혈청 cortisol 농도는 평균 32.84 ± 16.78 ng/ml로 catheter를 裝着한 그룹의 23.20 ± 10.29 보다 높았다. 연령에 있어서는 4~6개월령이 다른 연령보다 높게 나타났다.

Cortisol의 circadian rhythm은 명확하지 않았는데 이것은 채혈간격이 너무 길어서 명확하지 않았던 것으로 생각되어 채혈간격은 적어도 30분 이내가 적당할 것으로 생각된다.

參考文獻

1. Brearley JC, Dobson H, Jones RS. Investigation into the effect of two sedatives on the stress response in cattle. *J Vet Pharmacol Therap* 1990 ; 13 : 367~377.
2. Kempanian RJ, Sartin JL, Peterson ME. Effects of single intravenously administered doses of dexamethasone on response to the adrenocorticotrophic hormone stimulation test in dogs. *Am J Vet Res* 1989 ; 50 (11) : 1914~1917.
3. Thomas P, Wofford HW. High-Performance liquid chromatography of corticosteroids in vertebrate plasma : assay of cortisol mullet and corticosterone in the rat. *Comp Biochem Physiol* 1984 ; 78(2) : 473~479.
4. Shu-Hua Zhang, Hennessy DP, Cranwell D. Pituitary and adrenocortical responses to corticotropin-releasing factor in pigs. *Am J Vet Res* 19990 ; 51(7) : 1021~1025.
5. Weitzman ED, Fukushima D, Nogiére C, et al. Gallagher TF and Hellman L. Twenty-four hour pattern of the episodic secretion of cortisol in normal subjects. *J Clin Endocr Met* 1971 ; 33 : 14~22.
6. De Lacerda L, Kowarsik A, Midgeon CJ. Integrated concentration and diurnal variation of plasma cortisol. *J Clin Endocr Met* 1973 ; 36 : 227~238.
7. Minton JE, Cash WC. Effect of cranial sympathectomy on circadian rhythms of cortisol, adrenocortico-

- tropic hormone and melatonin in boars. *J Anim Sci* 1990 ; 68 : 4277~4284.
8. Alam MGS, Dobson H. Effects of various veterinary procedures on plasma concentrations of cortisol, LH and PGF₂ metabolite in the cow. *Vet Rec* 1989 ; 118 : 7~10.
 9. Charles E. Wood. Cortisol inhibits ACTH secretion in late-gestation fetal sheep. *Am J Physiol* 1991 ; 260 (29) 385~388.
 10. Martina Hoedemaker, Patricia G Westone. Influence of cortisol and different steroidogenic pathways on estrogen synthesis by the bovine placenta. *Am J Vet Res* 1990 ; 51(7) : 1012~1015.
 11. Leon JB, Smith BB, et al. Endocrine changes during pregnancy, parturition and the early post-partum period in the llama (*Lama glama*). *J Reprod Fert* 1990 ; 88 : 503~511.
 12. Masatoshi Takeishi, Shin Shibata and Shigehisa Tsumagari. Adrenocorticotropin and cortisol levels in the plasma of bovine fetuses and neonates. *Jpn J Vet Sci* 1989 ; 51(5) : 975~980.
 13. Mattingly DH, Martin, Christin Tyler. Fluorometric method for simultaneous estimation of cortisol, corticosterone and testosterone in plasma. *J Clin Pathol* 1989 ; 42 : 661~666.
 14. Gore M, Lester E. Comparison of fluorimetric method and a competitive protein binding assay kit for the determination of plasma hydroxycorticosteroids. *Ann Clin Biochem* 1975 ; 12 : 160~162.
 15. David C, Turnell, John D, Cooper H, et al. Totally automated liquid-chromatographic assay for cortisol and associated glucocorticoids in serum, with use of ASTED™ sample preparation. *Clin Chem* 1988 ; 34 (9) : 1816~1820.
 16. Cooper TR, Trunkfield HR, Zanella AJ, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay for cortisol in the saliva of man and domestic farm animals. *J Endocr* 1989 ; 123 : R13~R16.
 17. David E Lee, Stephen V Lamb, Thomas J Reimers. Effect of hyperlipemia on radioimmunoassay for progesterone, testosterone, thyroxine, and cortisol in serum and plasma sample from dogs. *Am J Vet Res* 1991 ; 52(9) : 1489~1491.
 18. Ellis G, Morris R. An one-tube micromethod for radioimmunoassay of plasma cortisol. *Clin Chem* 1978 ; 24 : 1954~1957.
 19. Michael McConway G and Richard S Chapman. Development and evaluation of a simple, direct, solid-phase radioimmunoassay of serum cortisol from readily available reagents. *Clinica Chimica* 1986 ; 158 : 59~70.
 20. Thomas J Reimers, Dennis Lawler F, Perry Sutaria M, Maria Correa T, Hollis Erb N. Effects of age, sex, and body size on serum concentrations of thyroid and adrenocortical hormones in dogs. *Am J Vet Res* 1990 ; 51(3) : 454~457.
 21. Ford EJH, Robinson IP, Evans J. An enzyme-linked immunoassay for the measurement of the concentration of cortisol in sheep plasma. *Res Vet Sci* 1990 ; 48 : 262~263.
 22. Lewis JG, Elder PA. Fraction of cortisol antisera by immunoabsorption chromatography : characterization and use in an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *J Steroid Biochem* 1984 ; 22(3) : 387~390.
 23. Lewis JG, Elder PA. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for plasma cortisol. *J Steroid Biochem* 1985 ; 22(5) : 673~676.
 24. Lefebvre DM, Gallo GF, Block E. The effect of assistance at calving injections of recombinant bovine somatotropin and jugular catheterization on serum cortisol and its influence on the GnRH-induced LH response in postpartum dairy cows. *Can J Anim Sci* 1990 ; 70 : 723~726.
 25. 姜正夫, 李孝宗, 崔尙龍. 소의 임신진단 Kit의 개발 II. 조기 임신진단 Kit의 개발. *大韓獸醫學會誌* 1991 ; 31(2) : 223~228.
 26. Fulkerson WJ. Synchronous episodic release of cortisol in the sheep. *J Endocr* 1978 ; 79 : 131~132.
 27. Jephcott EH, Mcmillen IC. Electroimmobilisation and ovine plasma cortisol concentrations : effect of current intensity, current duration and diazepam. *Res Vet Sci* 1988 ; 44 : 21~24.
 28. Roland valdes Jr, Michael WR, Savory J. Evaluation of an automated radioimmunoassay for serum cortisol. *Ann Clin and Lab Sci* 1980 ; 10(6) : 508~514.
 29. Masahiro Tagawa, Toshinori Sako, Hiroyasu Ejima, et al. Changes in plasma cortisol concentration by ages in dogs under ketamine and thiopental anesthesia. *Jpn J Vet Sci* 1989 ; 51(2) : 278~283.

30. Nanda AS, Dobson Ward. Relationship between an increase in plasma cortisol during transport-induced stress and failure of oestradiol to induce a luteinizing hormone surge in dairy cows. *Res Vet Sci* 1990 ; 49 : 25~28.
 31. Robert SAM, Passille BDE, St-Pierre N. et al. Effect of the stress of injections on the serum concentration of cortisol, prolactine, and growth hormone in gilts and lactating sows. *Can J Anim Sci* 1989 ; 69 : 663~672.
 32. Hudson S, Mullard M, Whittlestone WG, et al. Diurnal variations in blood cortisol in the dairy cow. *J Dairy Sci* 1975 ; 58 : 30~33.
 33. Macadam WR, Eberhart RJ. Diurnal variation in plasma corticoid concentration in dairy cattle. *J Dairy Sci* 1972 ; 55 : 1792~1795.
 34. Wagner WC, Oxenreider SL. Adrenal function in the cow. Diurnal changes and the effects of lactation and neuro-hypophyseal hormones. *J Ani Sci* 1972 ; 34 : 630~635.
 35. Bassett JM. Diurnal patterns of plasma insulin, growth hormone, corticosteroid and metabolite concentration in fed and fasted sheep. *Australian J Biol Sci* 1976 ; 27 : 167~181.
 36. McNatty KP, Cashmore M. Diurnal variation in plasma cortisol levels in sheep. *J Endocr* 1972 ; 54 : 361~362.
 37. Fulkerson WJ, Tang BY. Ultradian and circadian rhythms in the plasma concentration of cortisol in sheep. *J Endocr* 1978 ; 81 : 135~141.
-