

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07710

研究課題名(和文) 牛の被毛コルチゾール濃度の変動要因解析

研究課題名(英文) Study on factors that affect hair cortisol concentration of cattle

研究代表者

植竹 勝治 (UETAKE, KATSUJI)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：00312083

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ホルスタイン種牛の被毛中コルチゾール濃度に影響する各種要因について、(1) 新生子牛の出生時ストレスは、生後1週目よりも2週目に採取した被毛中コルチゾール濃度により反映されること、(2) 泌乳牛の被毛中コルチゾール濃度に対する季節の効果と季節×地域の交互作用が有意であり、3月から6月にかけてコルチゾール濃度の上昇は、寒冷地の方が急であること、(3) 泌乳牛の被毛中コルチゾール濃度の分散を説明する上で、採毛月が有意に寄与しており、乳量が次に寄与する傾向にあることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： Factors that affect hair cortisol concentration of Holstein cattle were detected. Results of this study indicated that (1) impact of stress at birth can be reflected in hair cortisol concentration of newborn calves two weeks later rather than one week later; (2) the effects of season of hair sampling and its combination with region on hair cortisol concentration of lactating cows are significant, and the rise in cortisol concentration from March to June is more intense in the cold-temperate region than in the warm-temperate region; (3) the month of hair sampling is significant predictor of the hair cortisol level of lactating cows, and milk yield is the second most associated variable.

研究分野：動物行動管理学

キーワード：牛 ストレス バイオマーカー 被毛 非侵襲

## 1. 研究開始当初の背景

ストレスが動物の健康性に及ぼす悪影響については論を俟たず、そのストレス強度を科学的に定量化するために、各種の生理的生体指標が用いられてきている。その代表格はストレス応答的に主に下垂体 - 視床下部 - 副腎皮質系 (HPA 系) を介して分泌されるコルチゾールであるが、従来用いられてきた血液、唾液、尿といった生体試料には、長年の研究データの蓄積により基準値がある程度整備されている利点がある一方で、採材に伴う侵襲性とその値への影響、試料の安定性・保存性 (要冷蔵・冷凍)、測定値が反映するストレス負荷との時間的關係性 (血液・唾液は即時、尿では採材前 12~24 時間を総体的に反映) の難点や制約がある (Russell ら 2012)。

そこで近年注目されているのが被毛 (ヒトでは毛髪) 中コルチゾール濃度の測定である。被毛試料は非侵襲性、試料の安定性・保存性 (室温保存可) に優れ、時間的にも数ヵ月から場合によっては数年にわたる長期間の評価も可能であると考えられるが、研究の歴史は他の生体試料に比べて浅く、動物のみならずヒトでも基準値が未整備な状況にある (Russell ら 2012)。基準値を整備するためには、その濃度に影響する要因について確認する必要がある。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、我が国を代表する乳用種牛であるホルスタイン種牛を対象に、その被毛中コルチゾールの基準値整備を意図して、牛の被毛中コルチゾール濃度に影響すると考えられる以下の各種要因について体系的に調べた。

## 3. 研究の方法

(1) 牛における潜在的ストレスイベントである出生について、その具体的なストレス要因の洗い出しと被毛中コルチゾール濃度への反映のタイムラグについて

夏季 (7 月) および秋季 (10 月) に出生したホルスタイン種新生子牛 6 頭から、生後 0 週目 (4 日後) 1 週目および 2 週目に、血液および被毛を採取し、血液は遠心分離後、被毛は洗浄・乾燥・粉碎・メタノール抽出後に、血漿中および被毛中コルチゾール濃度を酵素免疫測定法 (EIA) により測定した。生後 0 週目の血漿コルチゾール濃度に対する出生日の最高気温、出生に要した時間、母牛から分離されるまでの時間の影響の大きさを重回帰分析で比較した。

(2) 泌乳牛の被毛中コルチゾール濃度に産次・乳期・季節・地域間差があるかについて (横断的調査)

寒冷地 (北海道、酪農学園大学) と温暖地 (神奈川県、同畜産技術センター) のフリーストール牛舎で飼養されている搾乳牛から、初産・2 産・3 産以上の泌乳前期 (~90 日)・中期 (91~180 日)・後期 (181 日~) 牛それぞれ 1 頭ずつ計 9 頭を選定し、3、6、9、12 月に頸部から採毛した。超音波洗浄毛を 0.5 cm 以下にカットし、36 時間以上乾燥後、乾燥毛 20 mg をマイクロチューブに入れ、ビーズクラッシャーで 45 秒 × 2 回粉碎し、粉碎毛 20 mg が入ったマイクロチューブにメタノール 1 mL を加え、18 時間・37 度でインキュベーション後、マイクロチューブをドラフト内に静置してアルコールを飛ばし、コルチゾール EIA 用アッセイバッファ 200  $\mu$ L を加え、ボルテックスで 10 分間攪拌後、5 分間遠心分離し、上清をサンプルとして EIA 分析でコルチゾール濃度を測定した。

(3) 泌乳牛の被毛中コルチゾール濃度に対する産次・乳期・乳量・体重・ボディコンディションスコア・採毛月・毛色の影響について (縦断的調査)

神奈川県畜産技術センターのフリーストール牛舎で飼養されている搾乳牛を対象に、1 月 (19 頭) 3 月 (19 頭) 6 月 (19 頭) 9 月 (21 頭) に頸部から採毛した。ほとんどの牛が 4 回とも採毛できた。前述の方法で前処理 (洗浄・乾燥・粉碎) メタノール抽出した試料から EIA 分析によりコルチゾール濃度を測定した。

## 4. 研究成果

(1) 重回帰分析の結果、新生子牛の出生日の最高気温、出生に要した時間、母牛から分離されるまでの時間の 3 種の要因による重相関係数は 0.995 ( $P = 0.014$ )、各要因の偏相関係数は順に、0.986 ( $P = 0.016$ )、0.836 ( $P = 0.164$ )、0.296 ( $P = 0.704$ ) となり、出生日の最高気温による影響が最も大きかった。また、生後 0 週目の血漿コルチゾール濃度と生後 1 週目および 2 週目の被毛中コルチゾール濃度との相関係数は、それぞれ 0.509 ( $P = 0.30$ ) および 0.650 ( $P = 0.16$ ) となり、出生時ストレスは、生後 1 週目よりも 2 週目に採取した被毛中コルチゾール濃度により反映されることが明らかとなった。

(2) 分散分析の結果、泌乳牛の被毛中コルチゾール濃度 (pg/g) に対する季節の効果 ( $P < 0.001$ ) と季節 × 地域の交互作用 ( $P < 0.05$ ) が有意であった。季節間の多重比較では、6 月 ( $13.0 \pm 1.0$ ) と他の 3 季節との間および 9 月 ( $1.6 \pm 0.2$ ) と 12 月 ( $4.5 \pm 0.3$ ) との間に有意差 (いずれも  $P < 0.01$ ) がみられた。また、3 月から 6 月にかけてコルチゾール濃度の上昇は、寒冷地の方が温暖地よりも急であった (図 1)。

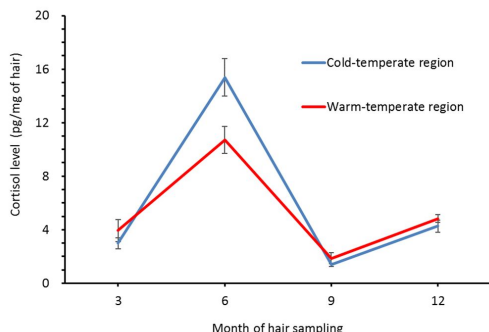


図1 寒冷地（青線）と温暖地（赤線）における泌乳牛の被毛中コルチゾール濃度（平均値±SD）の季節的推移

(3) 重回帰分析の結果、泌乳牛の被毛中コルチゾール濃度 (pg/g) の分散を説明する上で、採毛月が有意に寄与しており ( $\beta = -0.496$ ,  $t = -4.209$ ,  $P < 0.001$ )、乳量が次に寄与する傾向にあった ( $\beta = 0.263$ ,  $t = 1.989$ ,  $P = 0.052$ )。採毛月間の比較では、6月 (Me = 11.2, R=7.7 - 17.2) に最高値を示し、以下、1月 (4.4, 3.1 - 7.2)、3月 (2.2, 1.3 - 6.4)、9月 (1.4, 0.9 - 2.6) の順であった (図2)。

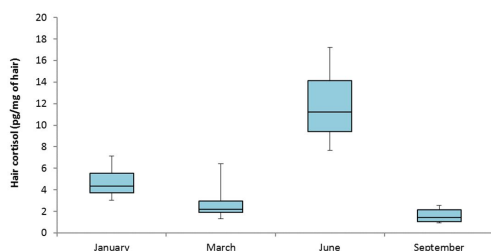


図2 泌乳牛の被毛中コルチゾール濃度（中央値、最大最小値、第1第3四分位値）の採毛月間比較

本研究の結果から、泌乳牛の内分泌ストレス反応の指標として被毛中コルチゾール濃度を使用する際には、その濃度に反映されるまでにストレスイベントから2週間程度のタイムラグがあること、およびその季節的変動や地域による季節的変動幅の違いを考慮する必要のあることが明らかになった。

#### <参考文献>

Russell E, Kore G, Rieder M, Van Hum S. 2012. Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: Current status, future directions and unanswered questions. *Psychoneuroendocrinol.* 37: 589-601.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

#### 〔雑誌論文〕(計 3 件)

Uetake, K., S. Hashimura, N. Sakagami and T. Tanaka. Residual impact of stress factors that newborn calves suffer just after birth. *Proc. The 17th AAAP Anim. Sci. Cong.*, 1463-1466, 2016.  
Uetake, K., S. Morita, N. Sakagami, K. Yamamoto, S. Hashimura, T. Tanaka. Hair cortisol levels of lactating dairy cows in cold- and warm-temperate regions in Japan. *Anim. Sci. J.*, 89: 494-497, 2018. Doi:10.1111/asj.12934  
Uetake, K., S. Morita, N. Sakagami, K. Yamamoto, S. Hashimura, T. Tanaka. Factors that determine cortisol level in hair of lactating dairy cows. *J. Appl. Anim. Res.* (under review).

#### 〔学会発表〕(計 3 件)

Uetake, K., S. Hashimura, N. Sakagami and T. Tanaka. Residual impact of stress factors that newborn calves suffer just after birth. *The 17th AAAP Anim. Sci. Cong.* 2016.  
植竹勝治・森田 茂・坂上信忠・山本和明・橋村慎二・田中智夫. ホルスタイン種泌乳牛の被毛中コルチゾール濃度に対する産次・乳期・季節・地域の影響. *日本畜産学会第122回大会*. 2017.  
植竹勝治・森田 茂・坂上信忠・山本和明・橋村慎二・田中智夫. ホルスタイン種泌乳牛の被毛中コルチゾール濃度に影響する要因. *日本畜産学会第124回大会*. 2018.

#### 〔図書〕(計 0 件)

#### 〔産業財産権〕

#### 出願状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

#### 取得状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

植竹 勝治 (UETAKE, Katsuji)  
麻布大学・獣医学部・教授  
研究者番号：00312083

### (2) 研究分担者

田中 智夫 (TANAKA, Toshio)  
麻布大学・獣医学部・教授  
研究者番号：40130893

森田 茂 (MORITA, Shigeru)  
酪農学園大学・農学生命科学部・教授  
研究者番号：70182243

### (3) 研究協力者

坂上 信忠 (SAKAGAMI, Nobutada)  
神奈川県畜産技術センター・企画部・主任  
研究員

橋村 慎二 (HASHIMURA, Shinji)  
神奈川県畜産技術センター・企画部・主任  
研究員

山本 和明 (YAMAMOTO, Kazuaki)  
神奈川県畜産技術センター・企画部・主任  
研究員