

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：30109

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K21314

研究課題名(和文) 毛中コルチゾールおよび唾液中オキシトシンによる新たなストレス評価法の確立

研究課題名(英文) Establishment of the new stress evaluation with hair cortisol and saliva oxytocin

研究代表者

林 英明 (Hayashi, Hideaki)

酪農学園大学・獣医学群・准教授

研究者番号：30405659

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)： 毛中コルチゾールおよび唾液中オキシトシンによる新たなストレス評価法を確立することを目的とした。

除角により毛中コルチゾールおよび唾液中オキシトシンは有意に増加した。被毛中コルチゾール含有量はDV順位が下位の牛群の方が上位の牛群よりも有意に高値を示した。飼養形態の違いは毛中コルチゾールに影響しなかったが、フリーストール飼養農場では農場間に有意な差が認められた。以上のことから、被毛中コルチゾール含有量は様々なストレス評価に用いることが可能であると示唆された。また、オキシトシンのストレスマーカーとしての応用が期待される。

研究成果の概要(英文)： It was aimed for the establishment of the new stress evaluation with hair cortisol and saliva oxytocin. Hair cortisol and saliva oxytocin significantly increased by dehorning. Hair cortisol concentration of subordinate group were significantly higher than that of dominant group. The difference of the feeding system did not influence hair cortisol, but was significantly different between farms at the free stall farm. Therefore, it was suggested that hair cortisol could be used for various stress assessment. In addition, the application as the stress marker of oxytocin is expected.

研究分野： 獣医生理学

キーワード： ストレス 被毛 オキシトシン

1. 研究開始当初の背景

高ストレス負荷が健康を阻害することは数多く報告されており、ストレスを評価し、管理することは疾病などの予防を考える上でも重要な課題となっている。このような流れの中、唾液中のコルチゾールは血中のコルチゾールと非常に相関が高く非侵襲的に採取でき、多くのストレス研究で用いられている (Psychol Bull. 130: 355-391, 2004 など)。近年では毛中にも血中からコルチゾールが移行することが明らかとなっており、慢性的なストレスとコルチゾールの関連についても検討されている。また、オキシトシンは幸福度を表す指標として近年注目されており、感情の変化により唾液中のオキシトシン分泌が変化することも明らかとなっている (Physiol Behav. 131:123-8, 2014 など)。

家畜ではストレスの指標として行動や血中コルチゾールを従来用いてきたが、より簡便に採取可能な便、尿、乳および唾液においてコルチゾールが血中から移行していることが明らかとなり、その有効性が検証され始めている (Anim Reprod Sci. 43, 43-63, 1996 など)。また、ウシにおいても毛中にコルチゾールが検出されることが近年明らかとなっている (Can J Vet Res. 75(3):216-21, 2011 など)。

ストレス評価の指標として血中コルチゾール濃度を測定するためには頻りに採血する必要があり、採血そのものがストレスとなってしまう。唾液は血中から5分程度のタイムラグで移行する事から、唾液中コルチゾールは新たなストレス評価の指標として利用することができると考えられるが、中長期的なストレス評価に用いるのは難しい。一方、ウシの体毛はターンオーバーがおよそ1~2ヵ月と言われており、生産されている際の血中コルチゾール濃度が毛中コルチゾールに反映されるため、生理学的側面から中長期的なストレス評価を行うことが可能であると考えられる。しかし、特に被毛においてはどのような要因によってコルチゾール含有量が影響されるのか全く分かっていない。

2. 研究の目的

ウシのストレス評価において、拘束や痛みを与えないより簡便に採取できる生理学的指標として、一定期間のストレス負荷による血中コルチゾール上昇を反映する毛中コルチゾールや、幸福・満足度の指標として検討されている唾液中オキシトシンに着目し、本研究ではストレス負荷時の血中コルチゾールや行動と毛中コルチゾールとの関係を明らかにすることにより、毛中コルチゾールおよび唾液中オキシトシンによる新たなストレス評価法を確立することを目的として、以下の3つの小課題を設定して実験を行った。

1) 血中、唾液中および毛中コルチゾールおよびオキシトシンの関係を明らかにする。

2) 行動的評価と毛中コルチゾールとの関係を明らかにする。

3) 飼養環境と毛中コルチゾールとの関係を明らかにする。

3. 研究の方法

1) 血中、唾液中および毛中コルチゾールおよびオキシトシンの関係を明らかにする。

哺乳期のホルスタイン種ウシを用いて、除角ストレス負荷試験を行った。除角前および6時間後まで採血および唾液の採取を行い、毛の採取は除角前、7日および28日後に肩部および臀部より白色および黒色の毛を採取し、それぞれのコルチゾール含有量をELISAにより測定した。また、除角前および6時間後までの唾液中オキシトシン濃度もELISAにより測定した。

2) 行動的評価と毛中コルチゾールとの関係を明らかにする。

搾乳牛群において行動学および生理学的な調査を行った。酪農学園大学附属農場のロボット搾乳牛舎のホルスタイン種メスウシ (n=13) を用いた。試験開始時に活動量および反芻時間計測用のネックタグ (Data Flow, CORNES AG.) を各個体に装着して1ヵ月間計測した。計測終了時に採血、唾液および被毛を肩部、臀部より白色、黒色の毛をそれぞれ毛刈りはさみを用いて採取した。血漿、唾液および被毛から抽出した溶液中のコルチゾール濃度はELISA法を用いて測定した。また、牛群内の順位については各牛のDV (Dominance Value) 値を求め序列化を行った。さらに、各個体の乳量についても計測した。

3) 飼養環境と毛中コルチゾールとの関係を明らかにする。

飼養形態の異なる複数の農場で飼育されている乳用牛において調査した。対象農場として、フリーストールで飼養されている8農場および繋ぎ飼いで飼養されている9農場からそれぞれ5頭ずつから採材を行った。被毛はブラシで脱落毛を除去したのち、臀部の白色被毛を約1gハサミで採取した。被毛イソプロパノールで洗浄後に乾燥させ、破碎した後にメタノールで抽出し、乾燥後にPBSで再懸濁した。被毛からの抽出液中のコルチゾール濃度はELISAキットにより測定した。

4. 研究成果

1) 血中、唾液中および毛中コルチゾールおよびオキシトシンの関係を明らかにする。

血漿中および唾液中コルチゾール濃度は除角後有意に増加した後、60分後には除角前の値まで戻り、以降も低い値で推移した (図1)。毛中コルチゾール含有量は肩部および臀部ともに白色毛においては除角7日後もしくは28日後で有意に増加した (図2) が、黒色毛

は除角により変化を示さなかった。また、除角前後において血漿中オキシトシン濃度は変化を示さなかったが、唾液中オキシトシン濃度は除角後有意に増加し、10分後には除角前の値に戻った(図3)。

本実験の結果より、除角のような短期的なストレス負荷であっても毛中コルチゾール含有量に影響を与えることが明らかとなり、非侵襲的かつ安易に採取可能なストレス評価としての有効性が示された。しかし、毛色や部位間で含有量が異なることは考慮しなければならないと考えられる。また、除角ストレス負荷は唾液中オキシトシン濃度に影響を与えることが明らかとなり、ストレス評価のマーカーとしてとしての有効性が示された。

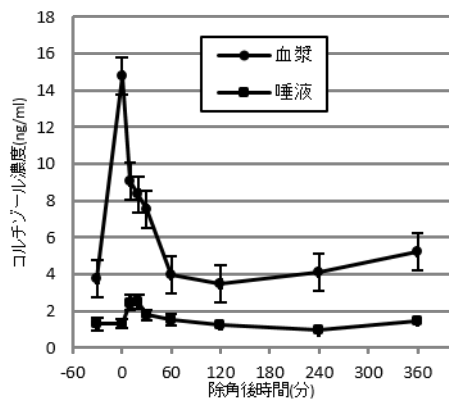


図1. 除角前後における血漿・唾液中コルチゾール濃度

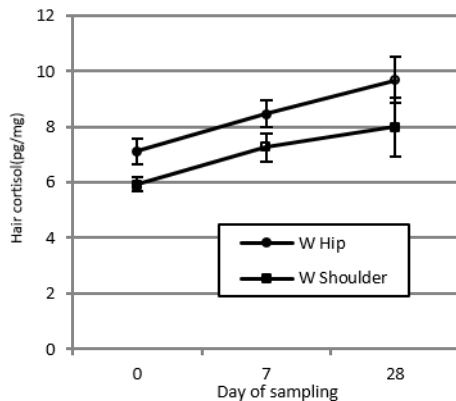


図2. 除角前後における被毛中コルチゾール含有量

○, □: 0日に対して有意差あり ($P < 0.05$)

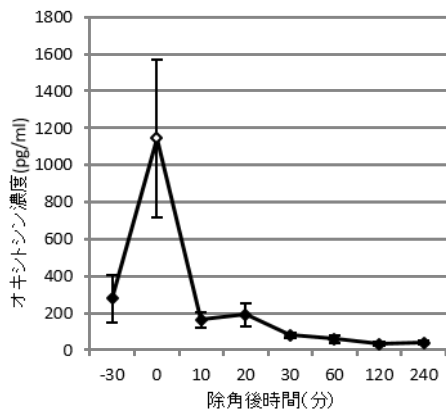


図3. 除角前後における唾液中オキシトシン濃度

◇: 除角前に対して有意差あり ($P < 0.05$)

2) 行動的評価と毛中コルチゾールとの関係を明らかにする。

DV 順位が上位の牛群と下位の牛群では、血漿中コルチゾール濃度に有意な差は認められなかったが、肩部の白色および臀部の黒色被毛中コルチゾール含有量は下位の牛群の方が上位の牛群よりも有意に高値を示した(図4)。DV 順位が上位の牛群と下位の牛群では、活動量において有意な差は認められなかったが、反芻時間は下位の牛群の方が上位の牛群よりも有意に高い値を示した。また、下位の牛群の方が上位の牛群よりも乳量は無意に高く、泌乳日数は有意に短かった。

本実験の結果より、牛群における順位付けが被毛中コルチゾール含有量に影響を与えていることが明らかとなり、牛群における社会的なストレスが被毛中コルチゾール含有量を用いて評価することができると示唆される。

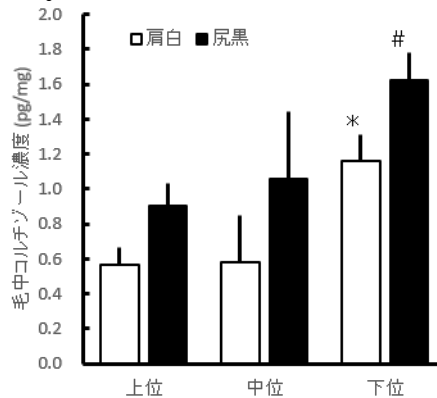


図4. 牛群のDV順位ごとの被毛中コルチゾール含有量

*, #: 上位に対して有意差あり ($P < 0.05$)

3) 飼養環境と毛中コルチゾールとの関係を明らかにする。

フリーストール牛群中の被毛中コルチゾール含有量 (5.6 pg/mg) と繋ぎ飼い牛群中の被毛中コルチゾール含有量 (5.2 pg/mg) の間に有意な差は認められなかった(図5, 6)。繋ぎ飼いで飼養されている農場ごとの被毛中コルチゾール含有量は、最も高い農場では 9.0 pg/mg、最も低い農場では 2.3 pg/mg であり、農場間で有意な差は認められなかった。一方、フリーストールで飼養されている農場ごとの被毛中コルチゾール含有量は、最も高い農場では 15.7 pg/mg、最も低い農場では 2.0 pg/mg であり、農場間で差が認められた。本実験の結果より、繋ぎ飼いとフリーストールという飼養形態の違いは被毛中コルチゾール含有量に影響を与えていなかったが、フリーストール飼養では農場間のばらつきが大きく、農場によっては飼養されている牛群が強いストレスを受けていることが示唆された。

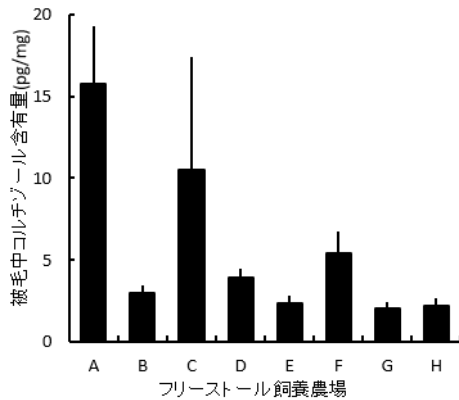


図5. フリーストール飼養農場の牛群における被毛中コルチゾール含有量

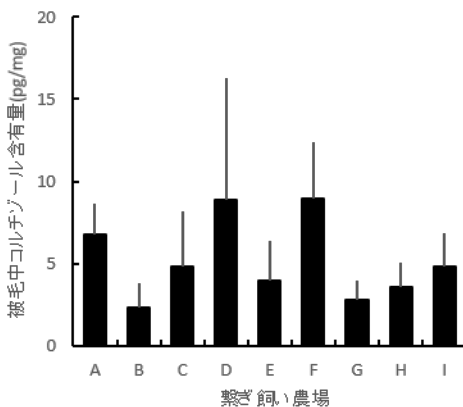


図6. 繋ぎ飼いの飼養農場の牛群における被毛中コルチゾール含有量

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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

2017年9月13日～15日 鹿児島市 鹿児島大学
 第160回日本獣医学会学術集会
 ウシ牛群における順位付けが被毛中コルチゾール含有量に及ぼす影響
 上野憲亮・松本真美・森田茂・林英明

2017年8月7日～10日 オーフス、デンマーク

51st Congress of the International Society for Applied Ethology
 Effect on hair cortisol by the dominance relationship in the cow group
 Hideaki Hayashi, Mami Matsumoto and Shigeru Morita

2015年9月14日～17日 札幌

The Congress of the International Society for Applied Ethology (ISAE)
 Effects of the short-term stress on hair cortisol concentrations in calves
 Hideaki Hayashi, Chigusa Arai, Yurie Ikeuchi, Subaru Fukushi, Shigeru Morita and Shinji Hoshiba.

〔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

林 英明 (HAYASHI, Hideaki)
 酪農学園大学・獣医学群・准教授
 研究者番号：30405659

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者

森田 茂 (MORITA, Shigeru)
 酪農学園大学・農食環境学群・教授
 研究者番号：70182243