

令和元年6月12日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18802

研究課題名(和文) 乳牛の発情・排卵障害における慢性ストレスの関与と被毛を用いた臨床評価法の検討

研究課題名(英文) Involvement of chronic stress in estrus and ovulation disorder of dairy cattle and clinical evaluation method by using hair samples

研究代表者

遠藤 なつ美 (Endo, Natsumi)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40726684

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：乳牛の発情・排卵障害の原因として慢性ストレスの関与が指摘されている。本研究では、慢性ストレスが牛の繁殖機能に及ぼす影響を明らかにするとともに慢性ストレスを臨床的に評価する方法として被毛コルチゾール濃度の分析に取り組んだ。まず、シバヤギに副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)を実験的に投与して血中コルチゾール濃度を増加させた結果、排卵卵胞の直径が増加し、卵胞の発育に影響を及ぼすことが示唆された。次に乳牛の分娩前後の被毛コルチゾール濃度を調べた結果、栄養状態や飛節スコアとの関連が認められ、初回授精の遅れや空胎日数の延長した牛では被毛コルチゾール濃度の変動パターンが正常牛とは異なることが認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳牛の発情・排卵障害の原因として慢性ストレスの関与が指摘されているが、動物が実際にどの程度のストレスを受けているかについて評価することが難しく未明な点が多い。本研究では、慢性ストレスが牛の繁殖機能に及ぼす影響を明らかにするとともに慢性ストレスを臨床的に評価する方法として被毛コルチゾール濃度の分析に取り組むことで、慢性ストレスが繁殖機能に影響を及ぼしている可能性を明らかにし、被毛コルチゾール濃度の分析が臨床評価に有用であることを確認した。

研究成果の概要(英文)：Chronic stress is considered to be associated with estrus and ovulation failure in dairy cattle. The present study was conducted to clarify the effect of chronic stress on reproductive function in dairy cattle and to evaluate hair cortisol concentrations as a clinical index of chronic stress. Firstly, administration of ACTH to female goats resulted in the increase of ovulatory follicles. Secondly, hair cortisol concentration during pre- and post-parturition in dairy cattle was examined. The results showed that hair cortisol concentrations were associated with body condition and hock health scores. Cows with delayed first AI and long days open showed different patterns in hair cortisol concentration after parturition as compared with normal fertile cows.

研究分野：獣医臨床繁殖

キーワード：慢性ストレス 乳牛 繁殖障害 被毛コルチゾール ヤギ 発情

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

牛の人工授精では、発情が確認されてから6~12時間後の授精適期に人工授精を実施し、その24時間後までに排卵が確認されれば、高い受胎率が得られると言われている。しかし、最近の酪農現場では、“牛が発情行動を示さずに排卵する”“適期と思って授精しても排卵せず、そのまま卵巣静止や卵胞嚢腫に移行する”といった発情・排卵過程の異常を示す牛が増えている。繁殖障害の増加は牛群の繁殖成績を低下させるため、酪農経営に大きな経済的損失を与えてしまう。この問題の解決には、その発症メカニズムに関与する神経・内分泌機構の解明に取り組むのと同時に、牛群の栄養状態や牛舎環境などの面から具体的な発症誘因を多元的に検証し得る研究アプローチが必要である。

発情・排卵障害の背景には、乳牛の乳量は飛躍的に増加したが、技術的な問題点として高泌乳牛を健康に維持するための設備や栄養面での管理が難しくなっていることが関与していると考えられる。また、これらの繁殖障害の治療と併せて重要なのは、予防法の検討である。そこで申請者が注目しているのは、発情・排卵障害の発症における慢性ストレスの関与である。野外での調査では、跛行による慢性ストレスは発情行動を微弱化させることや、牛群内で順位の低い牛は社会的ストレスが増加することにより乳量や受胎成績が低下するとの報告がある。また、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) の投与によりストレス時にみられるような血中コルチゾール濃度の上昇を実験的に誘起した場合、エストラジオール (E<sub>2</sub>) の産生が低下し排卵が遅延することや、発情行動、排卵時期に影響を及ぼすことが主に羊を用いた研究で報告されている。しかし、ストレスへの反応は種・個体差があり、“乳牛において発情・排卵障害の発症につながる慢性ストレスがどの程度のものか？”という疑問に対する答えは曖昧なままである。視床下部-下垂体-副腎皮質機能の活動を評価する新たなバイオマーカーとして、被毛を用いたコルチゾール濃度の分析が注目されている。コルチゾールは受動拡散により血液から毛包に移行し被毛に蓄積していくと考えられるため、採取した被毛の長さに応じて数週から数カ月といった長期間に渡る血中コルチゾール濃度の変化を捉えることができる。さらに、被毛は非侵襲的かつ容易に採取することができる、常温で長期保存できるという利便性も魅力の1つである。しかし、こうした被毛コルチゾール濃度の測定値が、ストレスに起因する血中コルチゾール濃度の上昇レベルや上昇期間をどの程度反映して変動しているかという点を説明するための基礎知見は非常に乏しい。被毛を用いた慢性ストレス評価法を確立させるためには、血液から被毛にコルチゾールが移行・蓄積する過程について定量的な検討が必要がある。

### 2. 研究の目的

乳牛の発情・排卵障害における慢性ストレスの関与について検証し、その内分泌機構を解明するため、ACTHの微量投与により慢性ストレスのモデル動物を実験的に作出し、性ホルモンの分泌パターン、発情行動の発現、卵胞の発育・排卵過程に及ぼす影響について明らかにする。さらに、被毛サンプルを用いた慢性ストレスの評価法を確立するため、コルチゾールが血流から被毛へどのように移行・蓄積するかを定量的な分析によって明らかにし、動物の年齢や体重、採取時期などの影響についても検討することで、臨床検査として被毛のサンプリングと慢性ストレスの評価を行う上で必須の基盤的情報を提示する。最後に、その評価法を用いて飼養形態の異なる牛舎において野外での調査を行い、乳牛の慢性ストレスの程度を個体ならびに牛群レベルで検証する。そして、無発情、排卵遅延といった発情・排卵障害の発生状況に加えて、初回排卵時期、黄体形成、人工授精後の受胎率などの主要な繁殖パラメータを調べることで、慢性ストレスが乳牛の繁殖成績にどのように影響を及ぼしているか明らかにする。さらに飼養管理状況や栄養状態を調査することにより、慢性ストレスと関連した繁殖障害のリスク因子を提示する (図1)。

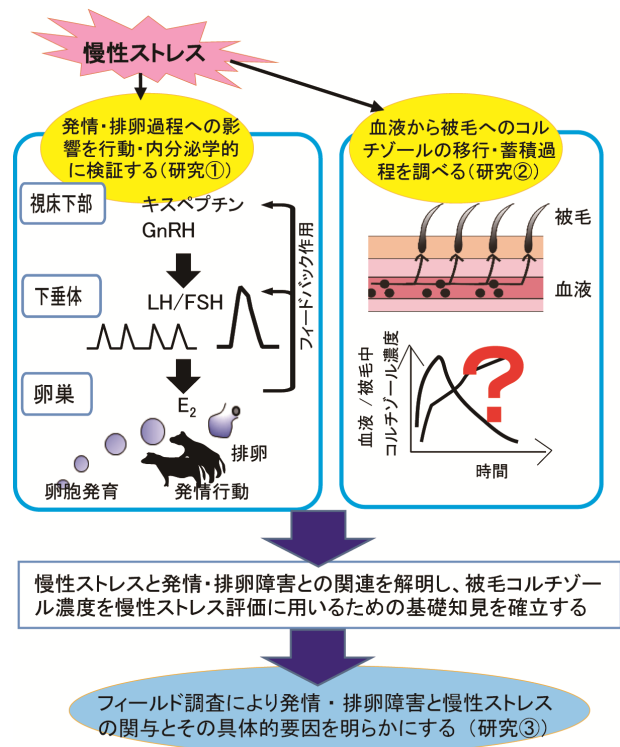


図1 研究の流れ

### 3. 研究の方法

本研究では、牛の発情・排卵障害における慢性ストレスの関与とその内分泌メカニズムを解明するため、慢性ストレス時に見られる血中コルチゾール濃度の上昇を牛の実験モデルであるシバヤギへのACTH投与によって実験的に誘起し、卵胞発育、発情行動、ホルモン動態への影響を検討した。さらに、被毛サンプルを用いた慢性ストレスの評価法を確立するため、コルチゾ

ールの血流から被毛への移行・蓄積過程を定量的に調査した。これらの基礎知見を踏まえ、実際の酪農現場において牛の慢性ストレスの程度を調査し、繁殖成績を中心とした飼養管理についても臨床総合的に評価した。

#### 4. 研究成果

(1) シバヤギに ACTH (0.625 IU /10 kg 体重、n = 6)あるいは生理食塩液 (n = 6)を排卵後 11 日から 1 日 1 回 7 日間筋肉注射した (実験 1)。実験 2 では、同量の ACTH あるいは生理食塩液 (それぞれ n = 6)を排卵後 11 日から 1 日 2 回 14 日間投与した。実験期間において発情はほとんどのヤギで観察され(実験 1 では ACTH 群と生理食塩液群でそれぞれ 6/6 および 4/6、実験 2 では 5/6 および 6/6)、全ての個体で排卵が観察された。しかしながら、排卵卵胞数は ACTH 群と生理食塩液群で有意に異なり、最大直径についても異なる傾向(P = 0.07)が群間で認め

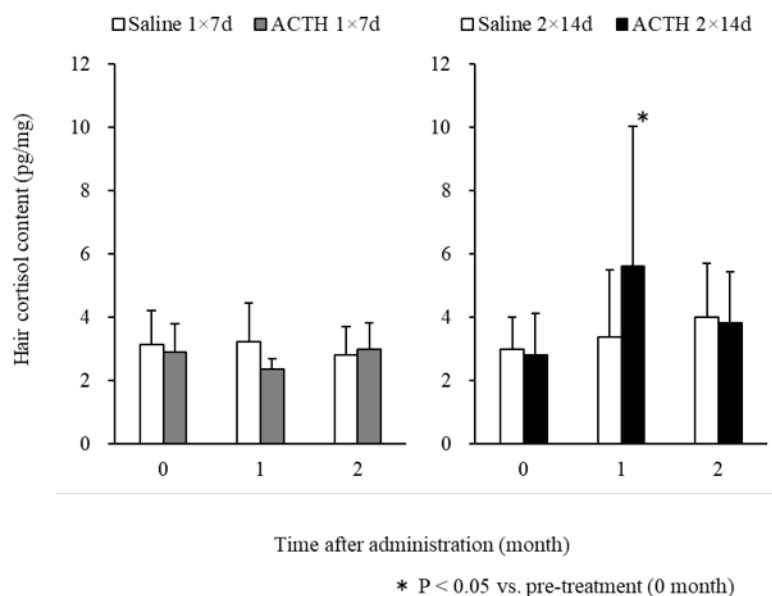


図2 ACTH投与後の被毛コルチゾール濃度

られた。実験 1 では ACTH 投与後 0、1、2 ヶ月において被毛コルチゾール濃度の変化認められなかったが、実験 2 では ACTH 投与後 1 カ月の被毛コルチゾール濃度が投与前と比べて有意に増加していたが、2 か月では有意差が認められなかった (図 2)。これらの結果から、ACTH 投与によるコルチゾール濃度の上昇は卵胞発育に影響を与え、比較的長期間の血中コルチゾール濃度の増加が被毛コルチゾール濃度に反映されることが明らかとなった。

(2) 牛における調査では 25 頭のホルスタイン種乳牛について、分娩後-19.2 ± 11.4、44.8 ± 11.9、103.0 ± 9.9 および 168.0 ± 9.7 日(各々L0、L1、L2 および L3 とする)に尾房部より被毛を採取した。さらに、ボディコンディションスコアならびに飛節スコアを被毛採取時に評価した。ボディコンディションスコアは被毛コルチゾール濃度と負の相関を示し(r = -0.255)、飛節スコアは正の相関を示した(r = 0.236、P < 0.05)。分娩後の被毛コルチゾール濃度は、初回人工授精の時期および受胎状況によって異なる変動パターンを示した。分娩後 86 日までに初回人工授精に供された牛は L1 において被毛コルチゾール濃度がピーク値を示したが、初回人工授精が 86 日より遅れた牛では L2 にピーク値を示した。低受胎牛(空胎日数 168 日)では L0 と比べて L1 および L2 の被毛コルチゾール濃度が有意に高かったが、正常受胎牛(空胎日数 < 168 日)では採材期間で有意な差は認められなかった。以上の結果から、健康状態に問題のある牛では慢性ストレスをより強く受けており、そのことが繁殖機能に影響を及ぼしている可能性が考えられた (論文投稿中)。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

N. Endo, H. Yamane, L. P. Rahayu, T. Tanaka (2018) Effect of repeated adrenocorticotrophic hormone administration on reproductive function and hair cortisol concentration during the estrous cycle in goats. *Gen Com Endocrinol* 259:207-212. doi: 10.1016/j.ygcn.2017.11.027. 査読有

N. Endo, L. K. Reimi, T. Tanaka (2017) Comparison of productive and reproductive performance and hair cortisol levels between Brown Swiss cross-bred and Holstein cows housed in the same barn. *Anim Sci J* 88:1506-1512. doi: 10.1111/asj.12828. 査読有

[学会発表](計 2 件)

N. Endo, T. Kitamura, M. Okubo, T. Tanaka. Profiles of hair cortisol concentrations in relation with health, nutrition and reproductive parameters in postpartum dairy cows. 第 30 回世界牛房学会, 札幌, 2018 年 8 月 31 日

遠藤 なつ美, 山根大明, 田中 知己. ACTH の反復投与がヤギの卵巣機能および被毛中コル

チゾール濃度に及ぼす影響. 平成 29 年度関東畜産学会, 群馬, 2017 年 11 月 10 日

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。