１３　乳牛の被毛中コルチゾールによるストレス評価の可能性

農業技術研究センター
○渡邉　康平、大澤　玲

Ⅰ　はじめに

牛は暑熱による呼吸数の増加により、活性酸素の産生が増加し、酸化ストレス状態となる。稲ホールクロップサイレージ（以下稲 WCS）は酸化ストレスを軽減することが確認されているビタミン A・E が多く含まれており、暑熱ストレス軽減効果が期待されている。また、県内では暑熱が数か月続くこともあり、この長期的なストレス状態を検証するためには、簡易な慢性的なストレス評価法の開発が必要である。

ストレス評価の方法として血中コルチゾールが用いられてきたが、血中コルチゾールは採材時のストレスを反映してしまう可能性がある。一方、毛髪中コルチゾールは発毛期間のストレスを反映するとの報告[1)]があり、長期的ストレスを評価できると考えられる。

そこで今回、ストレスの指標として使用されるコルチゾールの濃度の測定を簡易的に被毛より行う方法および被毛中コルチゾール濃度を利用した稲 WCS 給与による暑熱ストレス軽減効果を検証したため、報告する。

Ⅱ　材料及び方法

１　被毛中コルチゾール測定方法の検討

被毛中のコルチゾール測定方法について採材部位を変えて検討した。

（１）被毛の採材

試験前（令和４年８月 19 日）に試験に用いる予定の６頭の被毛の引き抜きにより臀部・尾房部より採材を行い、毛根も抽出材料に含めた。両部位とも被毛色は白色であった。

（２）抽出法

抽出法は、既報にある毛髪から抽出法[2)]を参考に行った。

ア　洗浄　　メタノールにより洗浄を行った。

イ　乾燥　　紫外線を遮断し、24 時間以上自然乾燥させた。

ウ　細断　　尾房部の被毛は毛根より 1cm、臀部被毛は約５mm にはさみにより細断した。

エ　抽出　　2.0ml マイクロチューブに 20mg の検査検体を入れ、メタノール 1.5ml により恒温槽にて 37℃24 時間抽出を行った。

オ　濃縮　　0.22μm フィルターにて精製した後、溶媒を自然乾燥させ、ELISA キットバッファーにより溶解を行った。溶解が困難な場合には超音波処理を行った。

カ　凍結保存　分析まで時間がかかる場合には-20℃で保存した。

（３）分析

ELISA キット（Cortisol ELISA Kit No.500360,Cayman CHEMICAL）を使用し、酵素結合免

疫測定(ELISA)により分析を行った。プレートリーダー(SoftMax® Pro7,MOLECULAR DEVICES)により吸光度の測定を行った。被毛中コルチゾールの測定値は被毛 1mg 中に含まれる量（pg/mg）とした。

２　稲 WCS 給与によるストレス軽減評価

稲 WCS 給与によるストレス軽減評価を行うため、暑熱期（令和４年８月 20 日～９月６日：試験期間 18 日）に一元配置による給与試験を実施した。対照区は粗飼料を輸入チモシー100%とした TMR を給与する３頭、試験区は粗飼料中 75%を稲 WCS に代替した TMR を給与する３頭とし、給与試験最終日に採材を行い、各区の比較を行った（表１）。

血漿中コルチゾールは試験期間前および試験 18 日目で頚静脈から採血を行い、血漿を分析まで-20℃で凍結保存した。分析は被毛と同様の ELISA キットを用いた。

表１　試験区

	発酵TMR中の組成	平均産次	平均搾乳日数	頭数
対照区	配合50%:輸入チモシー50%	1産	106日	3頭
試験区	配合50%:稲WCS37.5%:輸入チモシー12.5%	2.3産	118日	3頭

３　統計解析

被毛中コルチゾール測定方法の検討では、臀部および尾房部被毛のコルチゾール濃度は Microsoft® Excel の分析ツールにより t 検定を行った。

稲 WCS 給与によるストレス軽減評価における給与試験前後の被毛中コルチゾール濃度の比較についてはエクセル統計（株式会社　社会情報サービス，東京）を使用し、臀部および尾房部ごとに区と試験前後の二要因による二元配置分散分析を行った。それぞれ危険率を５%水準で差があるものを有意差ありと判定した。

臀部および尾房部と血漿中コルチゾール濃度の相関については、Microsoft® Excel の分析ツールにより行った。

Ⅲ　結果

１　熊谷地方の温湿度指数（THI）

暑熱の状態の確認には THI を利用し、熊谷地方気象台における平均気温・湿度より THI を求めた。牛は THI70 前後より暑熱ストレスを感じると言われており、試験期間前から試験全期間において THI70 以上を示し（図１）、強い暑熱ストレス下にあったことがうかがえた。

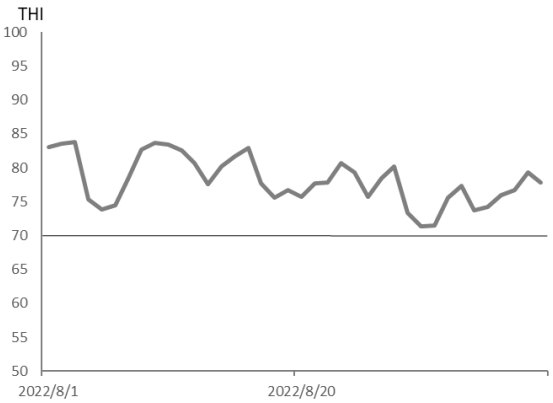

図１　熊谷市における THI

１　部位による被毛中コルチゾール濃度の比較

臀部と尾房部における被毛中コルチゾール濃度の比較を行ったが、被毛 1mg 中のコルチゾール濃度は臀部被毛で有意に高かった（図２）。

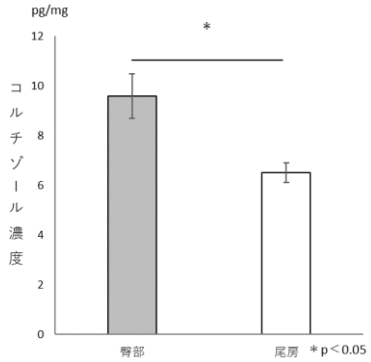

図２　臀部および尾房部被毛におけるコルチゾール濃度の比較

２　稲 WCS 給与によるストレス軽減評価

試験前と試験期間最終日のコルチゾール濃度に有意な差はみられず、稲WCSのストレス軽減効果は明らかにならなかった（図３）。

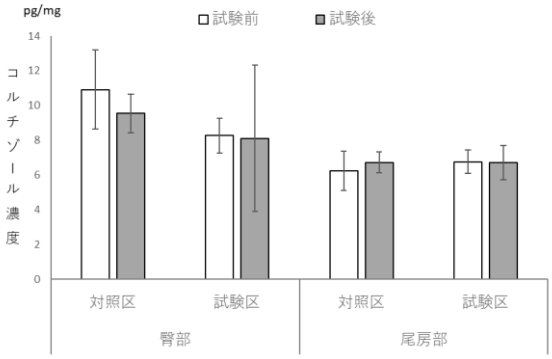

図３　給与試験前後の被毛中コルチゾール濃度の比較

稲 WCS 給与による血漿と被毛中コルチゾール濃度の相関を検討したところ、血漿コルチゾール濃度と臀部被毛中コルチゾール濃度は相関（r=0.72）が得られた（図４）が、尾房部被毛中コルチ

ゾール濃度では相関が得られなかった（図５）。

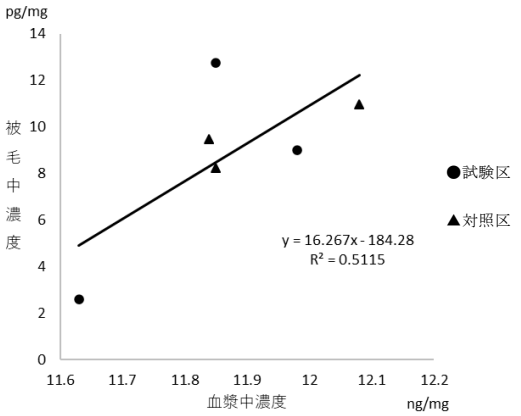

図４　臀部被毛と血漿中コルチゾール濃度の相関

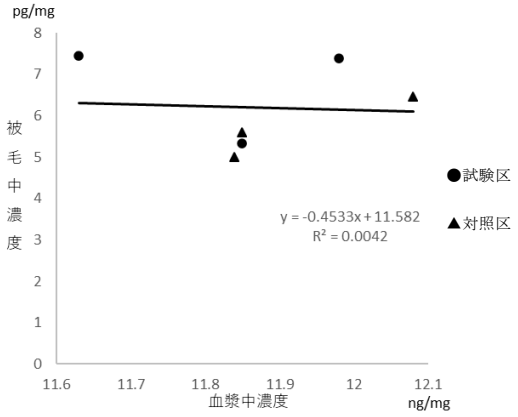

図５　尾房部被毛と血漿中コルチゾールの相関

Ⅳ　考察

部位による被毛中コルチゾール濃度の比較では、尾房部被毛と比較し、臀部被毛でより高濃度にコルチゾールが検出された。一方で、尾房部の被毛は体表の被毛と比較して伸長速度が速く[3)]、脱落なく伸び続ける[4)]との報告や稲 WCS 給与によるストレス軽減評価に供したサンプルでは、飼養試験前と最終日のコルチゾールの比較において、尾房部被毛の濃度が臀部被毛より個体間による差が小さくなったことから、長期的な蓄積を見る場合には季節による脱落のない尾房部被毛が有用である可能性が示唆された。既報では尾房部被毛の被毛中コルチゾール濃度が高く検出されたとの報告[3)]があるが、今回の結果とは異なった。これは鋏で細断したときと比較すると、粉砕機で処理した場合にコルチゾール濃度が高く検出されるとされており[3)]、今回の方法では臀部被毛を尾房部被毛より、より細かく細断したため、その影響があったと考えられた。

稲 WCS 給与によるストレス軽減評価においては、臀部および尾房部被毛においてコルチゾール濃度の有意な変化は確認できなかったが、今回設定した 18 日間の試験期間が短すぎた可能性も考えられ、今後慢性的なストレス評価を行う際には、さらに長期間での試験実施を検討する必要があると考えられた。

一方で血漿中コルチゾール濃度と臀部被毛中コルチゾール濃度の相関が得られたため、臀部被毛は血液と同様にコルチゾール評価の指標として利用できることが示唆された。被毛をコルチゾール濃度の測定に使うことで、採血や保定のような痛みを伴わない採材が可能で、苦痛に伴い一過性に上昇してしまうことを避けることができるため、一定期間のストレス評価として有用であると考えられた。しかし、糞尿による汚染[5)]や紫外線[6)]、泌乳ステージ、採材部位、被毛の処理方法等により被毛中コルチゾール含有量に影響がある可能性が報告されているため、被毛をストレス評価に利用するにあたっては、これらを考慮してさらなる検討が必要である。

Ⅴ　参考文献

1)　菅谷　渚ら．新しいストレス評価手法としての毛髪・爪コルチゾールの妥当性　心身医学 61:496-505,2021

2) 吉田 怜楠ら.毛髪コルチゾールの抽出手法の検討－粉砕を必要としない方法について 生体医工学 55:205-209,2017

3) Burnett ら. Factors affecting hair cortisol concentrations in lactating dairy cows J Dairy Sci 97:7685-7690,2014

4) 遠藤 なつ美.乳牛における被毛中コルチゾール濃度を指標とした慢性ストレスの評価 産業動物臨床医学誌 11(5):185-189,2020

5) It’s getting hairy-External contamination may affect the validity of hair cortisol as an indicator of stress in pigs and cattle General and Comprative Endocrinology 295,2020

6) Hair Coltisol:A Novel Biomarker of Hypothalamic-Pituitary-Adrenocotical Activity Endocrinology 153:4120-4127,2012