

尿中コルチゾールを
指標とした放牧牛のストレス
評価に関する研究

東山 由美

目次

第1章 緒論	1
1.1. ストレスとグルココルチコイドについて	1
1.2. ウシにおけるストレス刺激によるコルチゾール分泌	2
1.3. 放牧牛のストレス評価について	3
1.4. 本研究の目的と意義	6
第2章 ストレス指標としての尿中コルチゾールレベル	8
2.1. ACTH投与が尿中コルチゾールレベルに及ぼす影響	10
2.1.1. 緒言	10
2.1.2. 材料および方法	11
2.1.3. 結果および考察	13
2.2. 社会的隔離ストレスが尿中コルチゾールレベルに及ぼす影響	22
2.2.1. 緒言	22
2.2.2. 材料および方法	23
2.2.3. 結果および考察	24
2.3. 除角および去勢が尿中コルチゾールレベルに及ぼす影響	31
2.3.1. 緒言	31
2.3.2. 材料および方法	32
2.3.3. 結果および考察	33
2.4. 小括	36
第3章 飼育方式がウシのストレスレベルに及ぼす影響	37
3.1. 飼育方式が日本短角種における尿中コルチゾールレベルに及ぼす影響	39

3.1.1.	緒言	39
3.1.2.	材料および方法	40
3.1.3.	結果および考察	42
3.2.	飼育方式がホルスタイン種における尿中コルチゾールレベルに及ぼす 影響	48
3.2.1.	緒言	48
3.2.2.	材料および方法	49
3.2.3.	結果および考察	52
3.3.	飼育方式によって変化する尿中コルチゾールレベルの日本短角種およ びホルスタイン種における品種間比較	63
3.3.1.	緒言	63
3.3.2.	材料および方法	64
3.3.3.	結果および考察	67
3.4.	小括	76
第4章	総合考察	78
4.1.	ストレス指標としての尿中コルチゾールレベルについて	78
4.2.	放牧牛のストレス評価と課題について	79
4.3.	今後のストレス研究の展開と方向性	82
第5章	摘要	83
	謝辞	86
	Summary	87
	引用文献	90

第1章 緒論

1.1. ストレスとグルココルチコイドについて

Hans Selye は、医学・生理学界で、今日的な意味合いでの「ストレス」という言葉を初めて用いた。彼はストレスを「生体が外部から刺激を受けて緊張やひずみの状態を起こした時に、これらの刺激に対する特異的な反応に加えて、刺激の種類によらずに一定のパターンを示す非特異的な反応」とし、これをもたらす刺激を「ストレッサー」と定義し、ストレスとストレッサーを区別している (Selye 1946)。しかし最近では、健康障害に結びつく有害なストレッサーやストレス反応をまとめて「ストレス」と呼ぶようになっており (桑野ら 2010)、日常生活においても、ストレスがたまる、ストレスを発散させる、育児ストレス、介護ストレス、環境ストレスなど、広範囲にわたって「ストレス」という言葉が日常的に用いられている (二木 2007)。

生体がストレスにさらされると、視床下部—下垂体—副腎皮質系 (hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis: HPA 系) と、視床下部—交感神経—副腎髄質系 (sympathetic nervous-adrenal-medullary axis: SAM 系) の主に 2 つの系に種々の変化が起こり、複雑なストレス反応が発現する (中村ら 2000)。特に、HPA 系により副腎皮質から分泌されるグルココルチコイドは、血液中濃度が比較的高いことから、ストレス指標のゴールドスタンダードと呼ばれており、その血液中濃度はストレス指標として一般的に認められており、多用されてきた (山口 2007)。また、ストレッサーの強度によっても反応が段階的に変化するため、ストレス研究においてグルココルチコイドを測定することは有益であると言われている (Terlouw ら 2009)。グルココルチコイドは、コレステロールから生合成されステロイド骨格をもつことからステロ

イドホルモンとも呼ばれている。グルココルチコイド分泌が関与する HPA 系では、ストレス刺激により、視床下部から副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (corticotropin-releasing hormone: CRH) が産出され、下垂体門脈中に放出される。この CRH が脳下垂体前葉からの副腎皮質刺激ホルモン (adrenocorticotrophic hormone: ACTH) 分泌を促進し、これが副腎皮質からのグルココルチコイド分泌を促す。さらに、ストレス刺激が過剰に伝わらないようにフィードバック機能があり、グルココルチコイドは CRH, ACTH 分泌を抑制し、ACTH は CRH 分泌を抑制する。

1.2. ウシにおけるストレス刺激によるコルチゾール分泌

ウシでの主なグルココルチコイドはコルチゾールである (Mormede ら 2007)。急性ストレスによる血液中コルチゾール濃度の上昇は、これまでにウシにおいても数多く報告されてきた。例えば、輸送 (Grigor ら 2001)、除角 (Stafford と Mellor 2005)、去勢 (Stewart ら 2010)、社会的隔離 (Boissy と LeNeindre 1997) といったストレスラーによって、ウシの血液中コルチゾール濃度は大きく上昇する。このような急性ストレスが生体に加わった場合は、血液中コルチゾール濃度は急速に増加し、数分から数十分でピークに達した後、刺激前のレベルに戻る (Mormede ら 2007)。一方、ストレスが持続するあるいは繰り返されるような慢性ストレスについては、急性ストレス負荷時のような急激な一過性のコルチゾール濃度の明らかな上昇は認められない。慢性ストレスによる血液中コルチゾール濃度の基礎値の変化についてはいくつか報告されているが、結果は必ずしも一致しない。Fisher ら (2002) らは、泌乳牛を用い、横臥を制限するような処理を 1 週間行くと、コントロールと比較し、血漿中コルチゾール濃度の基礎値が上昇したと報告している。また、Barnett ら

(1988) らは、ブタを用い、長期にわたってつなぎ飼いで飼育すると、グループ飼いた群と比較し血漿中コルチゾール濃度の基礎値が上昇したと報告している。一方、子牛を長期にわたり隔離すると、血漿中コルチゾール濃度の基礎値が減少したという報告 (van Reenen ら 2000) や、長期にわたる隔離や横臥制限は、泌乳牛の血漿中コルチゾール濃度の基礎値に変化を及ぼさないという報告 (Munksgaard と Simonsen 1996) もある。このように、慢性ストレスによる血液中コルチゾール濃度の基礎値に関しては統一した見解が得られていない。この原因として、コルチゾール分泌には日内変動があり (Mostl と Palme 2002) , また採血行為自体がストレッサーになるため (Morton ら 1995; Hopster ら 1999) , コルチゾールによる慢性ストレスの検出が難しいことが考えられる。しかしながら、実際には、慢性ストレスによりわずかながらコルチゾールの基礎値は上昇すると言われており (Mormede ら 2007; Trevisi と Bertoni 2009) , より詳細に研究されているラットにおいても、ストレッサーの種類により反応の経路は異なるが、いずれにしても、慢性ストレスによって血液中コルチゾール濃度の基礎値は高く維持すると報告されている (樋口 2000) .

1.3. 放牧牛のストレス評価について

わが国では「放牧」という飼育方式が見直されてきている。わが国の畜産は、本来、放牧により行われてきたが、昭和 30 年代前後に、役肉用から肉専用へと家畜の飼育目的が変化するのに伴い、放牧は急速に衰退し、海外からの輸入飼料に依存した舎飼いへと転換してきた (蔦谷 2003) . その結果、わが国の飼料自給率はわずか 26% (2012 年度: 農林水産省生産局畜産部畜産振興課 2014) と先進国の中でも著しく低くなっている。また、近年の口蹄疫や BSE

の発生を受け、消費者の食の安全、安心を求める声が一層強まるなか、家畜の生産性のみを追求してきたこれまでの輸入飼料依存型畜産が疑問視され始めている。それらを解決する対策として、ウシを放牧することは有効であり、農林水産省が2010年に策定した「酪農及び肉用牛生産の近代化を図るための基本方針」においても、放牧の推進が盛り込まれている（農林水産省2010）。2004年には、全体に対する放牧導入農家が、乳用牛では18.3%、肉用牛では6.6%だったのに対し、2011年には、乳用牛で30.8%、肉用牛で12.9%と大きく伸びている。しかし、2013年には、乳用牛で29.9%、肉用牛で11.7%と、いずれも横ばいあるいは微減となり、土地条件等の制約があり放牧導入が難しい地域もあるが、さらなる放牧の普及活動が必要である（農林水産省大臣官房統計部生産流通消費統計課2013）。

放牧は、ウシにとってストレスが少なく快適な飼育方式であると一般的に思われている。ウシを放牧すると、ウシは自由に歩きながらのんびり草を食み、ゆったりと反芻、休息しているように見えるからである。さらに、放牧により繁殖成績が向上した、ウシが健康になった、ウシの毛づやが良くなった等々、放牧によるメリットを耳にすることも多い。しかしながら、いずれもが経験的知識や人間の主観による部分が多く、科学的根拠は薄い。逆に、放牧牛は、気象環境の影響を直接受け、また、小型ピロプラズマ病をはじめとするいわゆる放牧病の発病リスク等、その外部環境は非常に厳しい。これらのことから、放牧飼育によるウシのストレスレベルや快適性について、科学的に明らかにすることが非常に重要になってくる。もし、放牧がウシにとってストレスの少ない飼育方式であると科学的に提示できれば、わが国における放牧の普及につながると考えられる。そのためには、放牧牛のストレスを客観的にとらえ的確に評価しなければならない。

放牧牛のストレスを評価するにあたっては、1.2.で述べたように、放牧牛の

血液中コルチゾール濃度を測定することが考えられる。しかしながら、その場合、前述したように採血行為自体がストレッサーとなり、コルチゾール濃度が高まる危険性がある (Morton ら 1995; Hopster ら 1999)。特に放牧牛は、舎飼い牛と異なり、ヒトとの接触の機会が減るため、採血のためのヒトによる追い込み、保定、加えて採血行為が著しいストレッサーとなり、放牧牛を対象とした血液中コルチゾール濃度によるストレス評価は、正確性に欠けると考えられる。

そこで、血液に代わって痛みや苦痛を伴わずに採取できる生体試料を用い、その中に含まれるコルチゾールあるいはその代謝産物をストレス指標として利用した研究が、家畜や動物園動物を対象に近年数多く報告されている。例えば糞 (Möstl ら 1999; Morrow ら 2002; Mateo と Cavigelli 2005)、尿 (Hay ら 2000; Anestis 2009)、唾液 (Negrao ら 2004; Young ら 2012)、ミルク (Verkerk ら 1998; Fukasawa ら 2008)、毛 (Davenport ら 2006; Peric ら 2013) などを用いて検討されている。なかでも尿は、その採取が非侵襲的に行えることに加え、コルチゾールの主な排泄ルートであり、その排泄は数時間にわたって蓄積されるためコルチゾールの日内変動を緩衝でき、慢性ストレスによるコルチゾールの基礎値の変動を検出できる試料であると考えられている (Mormede ら 2007)。また、尿へのコルチゾール排泄のうち多くが肝臓で代謝されグルクロン酸等の抱合を受けるが、一部は遊離コルチゾールとして排泄され、それは血液中遊離コルチゾールと並行的に変動すると言われている (Lindholm と Schultz-Möller 1973)。しかし、尿中コルチゾールに関してウシを対象動物とした報告は非常に少なく、尿中コルチゾールの血液中コルチゾールに代わるストレス指標としての有効性、さらに放牧牛での応用の可能性については不明である。

1.4. 本研究の目的と意義

本研究では以上の知見をふまえ、ウシを対象動物とし、非侵襲的に採取できる尿を用いたストレス評価法を確立するとともに、放牧牛のストレスを客観的に評価することを目的とした。

第2章では、コルチゾール分泌を増加させるACTHをウシの静脈中に投与し、その時の血液中および尿中コルチゾールを調べ、血液の代替としての尿利用の可能性について検討した。なお、血液についてはその濃度を用いているが、尿については、実用的観点から24時間蓄尿ではなく、採取が簡単なスポット尿を用いたため、尿の濃さを補正する目的でクレアチニンに対する比（尿中コルチゾールレベル）を用いた（Klanteら1997）。次に、ACTH投与のような薬物による負荷ではなく、実際に起こりうるストレス、すなわち、社会的隔離、除角または去勢といった、精神的および肉体的ストレス負荷時における尿中コルチゾールレベルの変化を調べ、ストレス指標としての尿中コルチゾールレベルの有効性について検討した。

第3章では、尿中コルチゾールレベルを用い、放牧や舎飼いといった飼育方式とストレスの関係について、日本短角種を用いて検討した。しかし、放牧適正には品種間差があるといわれており（Prendivilleら2010）、特に日本短角種は、夏山冬里方式と呼ばれるように、夏は山で伝統的に放牧されてきた品種である（高安1983）。そこで、日本短角種以外に、ウシの代表品種であるホルスタイン種についても、日本短角種と同様に、放牧や舎飼いといった飼育方式が尿中コルチゾールレベルに及ぼす影響について検討した。しかし、ホルスタイン種は暑熱に非常に弱い品種であり（Sharma1983）、放牧や舎飼いといった飼育方式だけではなく、暑熱についてもあわせて検討する必要性が生じた。そこで、日本短角種とホルスタイン種における、飼育方式や暑熱が尿中コルチ

ゾールレベルに及ぼす影響について調べ、品種間で比較検討した。

これらの研究によって、ウシにおいて尿中コルチゾールレベルがストレス指標となることが明らかにされれば、実際の現場でウシのストレスレベルが簡易に測定できる。そのことにより、よりストレスの少ない飼育管理が実現し、生産性の向上につながることを期待される。また、この指標を用いて、放牧牛のストレスレベルを客観的に把握できれば、これまで主観的に論じられてきた、放牧はウシにとってストレスが少なく快適な飼育方式、という発想について科学的に考察できる。また、放牧推進政策の裏付けとなり、わが国の飼料自給率向上につながると考えられる。これらの研究は、近年、世界的に広まっているアニマルウェルフェア研究の一助になると期待される。

第2章 ストレス指標としての尿中コルチゾールレベル

コルチゾールは、ほ乳類において、急性ストレス負荷時に HPA 系が活性化し、副腎皮質より分泌されるホルモンである。そのため、コルチゾールの血液中濃度は急性ストレスの指標として用いられることが多い。慢性ストレス負荷時には、血液中コルチゾール濃度はわずかに上昇するとされている (Mormede ら 2007; Trevisi と Bertoni 2009)。しかし、採血行為自体が著しいストレッサーになるため (Morton ら 1995; Hopster ら 1999)、血液中コルチゾール濃度による慢性ストレスの検出は難しいとされている。また、大型動物においては、採血のための隔離や保定に困難を伴うことも多い。そこで、血液以外で、非侵襲的に採取が可能な生体試料を用い、その中に含まれるコルチゾールあるいはコルチゾール代謝産物が、ストレス指標として利用できるかについて検討した研究が、家畜や動物園動物を対象に数多く報告されている (Fukasawa ら 2008; Peric ら 2013)。中でも尿は、採取する際に家畜の拘束を必要としない上、コルチゾールの主な排泄ルートであり、その排泄は数時間にわたって蓄積されるため、コルチゾールの日内変動を平準化できる生体試料であると考えられる (Mormede ら 2007)。しかし、ウシにおける尿中コルチゾールに関する報告は少ない。そこで本章では、ウシにおいて尿中コルチゾールは血液中コルチゾール濃度を反映するのかについて調査するため、副腎皮質からのコルチゾール分泌を促進するホルモンである ACTH をウシに投与した時の尿中コルチゾールの反応について調べた。次に、実際のストレッサーとして、社会的隔離や除角、去勢といった、精神的および身体的ストレッサーをウシに負荷し、その時の尿中コルチゾールを調べ、そのストレス指標としての有効性について検討した。試料としての尿は、実用的観点から 24 時間蓄尿ではなく、採取が簡単なスポット尿とし、尿中コルチゾールは、尿の濃さを補正

するためクレアチニンに対する比(尿中コルチゾールレベル)で表した(Klante
ら 1997)

2.1. ACTH 投与が尿中コルチゾールレベルに及ぼす影響

2.1.1. 緒言

ストレスホルモンともいわれるコルチゾールは、副腎皮質より血液中に分泌されるが、その後、主に肝臓や腎臓で 11β ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼによって不活性型のコルチゾンへと可逆変換される (Fig. 2-1)。コルチゾールおよびコルチゾンは肝臓で還元され、 5α -テトラヒドロコルチゾール (THF α)、 5β -THF (THF β) またはテトラヒドロコルチゾン (THE) となり、グルクロン酸と抱合し水溶性となって尿中に排泄される。尿中に排泄されるコルチゾールの多くは THF および THE であり、遊離コルチゾールも少量ではあるが排泄される (熊谷と七星 1969)。このことはヒトを対象に得られた知見であるが、ウシにおいては、コルチゾールは THF や THE とほぼ同程度尿中に排泄され (Pavlovic ら 2013)、その大部分は遊離型である (Antignac ら 2002)。THF や THE のように、ステロイド骨格の 17, 21 位に水酸基、20 位にケトン基を有するステロイドは、コルチゾールも含めて 17 ヒドロキシコルチコイド (17-OHCS) と呼ばれており、硫酸溶液中でフェニルヒドラジンと呈色反応 (Porter-Silber 反応) を示す。このことから、ヒトの分野では、尿中 17-OHCS を測定することによって、コルチゾール分泌を検討している報告も多い (Taniyama ら 1993; Ohashi ら 2001)。また、尿中には遊離コルチゾールも排泄されることから、尿中コルチゾールを直接測定することによりコルチゾール分泌を検討したものが、ヒト (James ら 2008; 井上と桑野 2013)、ブタ (Hay ら 2000; Foury ら 2007)、イヌ (Blackwell ら 2010; Titulaer ら 2013)、ネコ (Lichtsteiner と Turner 2008; Uetake ら 2013)、チンパンジー (Muller と Wrangham 2004; Anestis 2009)、ヒツジ (Miller ら 1991) などで報告さ

れている。ウシにおいては、Redbo (1993) が尿中コルチゾールをつなぎ飼いの時のストレス指標に用いた研究を報告している。しかし、その報告で使われた試料は 24 時間の蓄尿であり、ウシを対象に 24 時間の尿を採取することは糞の混入の問題や、採取のためのハーネス装着自体がストレッサーとなり得る恐れがある。尿中クレアチニンに対する比を用いることで尿の希釈を補正できるとされるが (Klante ら 1997) , ウシにおいてスポット尿を用い、その中に含まれるコルチゾールや 17-OHCS に関する報告は非常に少なく詳細は不明である。そこで、副腎皮質からのコルチゾール分泌を促進するホルモンである ACTH をウシに投与し、その時の尿中クレアチニンに対する尿中コルチゾール、尿中 17-OHCS、および血液中コルチゾール濃度について調べ、尿中コルチゾールレベルは血液中コルチゾール濃度の代替になり得るのかについて検討した。

2.1.2. 材料および方法

(1) 供試動物および試験方法

試験は東北農業研究センター内 (岩手県盛岡市) で行った。日本短角種経産牛 3 頭 (平均体重 595 ± 51 kg) を供試した。飼料は 1 日 1 頭あたり濃厚飼料 1 kg, 粗飼料としてオーチャードグラスサイレージを乾物重量で 8 kg 給与した。濃厚飼料はトウモロコシ, コーングルテンミール, ふすま, 米ぬか, 菜種粕, および大豆粕が主原料であった。飼料は, 9 時と 16 時の 1 日 2 回等量を給与した。供試牛はスタンションで個別に繋留されていた。供試牛には, 試験開始 2 時間前に頸静脈にカテーテルを装着した。40IU の ACTH (Sigma, St. Louis, MO, USA) を 2ml の生理食塩水で溶解したものを, 2 時間の間隔をあけて 2 回, 頸静脈カテーテルより投与した。これは, できるだけ少ない ACTH 投与量で, 血漿中コルチゾール濃度の上昇を数時間持続させる方法である (Verkerk ら

1994; Stelwagen ら 1998) . 対照として, 2ml の生理食塩水を ACTH と同様に投与した. ACTH 投与と生理食塩水投与は, 少なくとも 1 週間の間隔を開けて実施した.

(2) 試料採取

ACTH または生理食塩水の頸静脈カテーテル投与を 0 および 120 分とした場合, -30, 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330, 360 分, および 12, 24, 48 時間後に頸静脈カテーテルより血液を採取した. 血液は, ヘパリン入りのチューブに採取し遠心したのち, 血漿を分析まで -20°C で保存した. 尿については, 試験開始から採血が終了するまでの間, 各供試牛のすべての自然排尿について, スポット尿として個別に回収した. 各尿のうち 30ml をフィルターで濾過し不純物を取り除き, 分析まで -20°C で保存した.

(3) 分析方法

血漿および尿中コルチゾールは, 市販の EIA キット (Neogen, Corp., Lexington, KY, USA, 現取り扱い; Oxford Biomedical Research, Inc., Oxford, MI, USA) を用いて測定した. ウシの尿中コルチゾール分析については, 希釈試験及び添加回収試験を行いその分析方法の有効性について確認した. すなわち, ウシの尿を段階希釈して測定し, 横軸に希釈度の逆数, 縦軸に測定値をとった時, その直線は原点を通る直線となった (Fig. 2-2) . また, ウシの尿に外因のコルチゾールを添加した場合, 84.4% という高い回収率を示した (Table 2-1) . 以上のことから, 本キットによるウシの尿中コルチゾール分析は可能であると判断した. 尿中 17-OHCS は, Porter-Silber 反応を利用し測定した (神戸川 1977) . 尿中コルチゾールおよび尿中 17-OHCS は, 尿中クレアチニンにより尿の希釈を補正した (Klante ら 1997) . クレアチニンは, Jeffe 法により測定した (クレアチニンテストワコー, 和光純薬, 大阪, 日本) . 尿中コルチゾールレベルおよび尿中 17-OHCS レベルは, ng/mg クレアチニンを単位と

した。

(4) 統計処理

血液中コルチゾール濃度，尿中コルチゾールレベルおよび尿中 17-OHCS レベルは，SAS (Version9.21; SAS Institute, Cary, NC, USA) の MIXED プロシジャを用い，個体を変量効果，処理，時間およびそれらの交互作用を母数効果として解析した．交互作用が有意な場合においては，処理ごとに時間を母数効果とし Scheffe の多重比較を行った．また，時間ごとに処理を母数効果とし解析した．

2.1.3. 結果および考察

ACTH または生理食塩水を投与した時の血漿中コルチゾール濃度，尿中コルチゾールレベルおよび尿中 17-OHCS レベルについて，代表して 1 頭の試験牛における経時変化を Fig. 2-3 に示した．血漿中コルチゾール濃度は，すべての試験牛で，2 回の ACTH 投与によりいずれも急速に (< 0.5 時間) 上昇し，各投与後 2 時間以内に投与前のレベルに戻った．尿中コルチゾールレベルは，血漿中コルチゾール濃度とほぼ同じ反応曲線を示した．本試験で用いた Verkerk らによる ACTH 投与の方法は，高い血液中コルチゾール濃度を数時間持続させるものであった．しかし，Verkerk らが用いた供試牛の平均体重が 471 kg であったのに対し，本試験における供試牛の平均体重は 595 kg と大きかったために，数時間にわたる高い血液中コルチゾール濃度を維持できなかったと思われた．しかし，血液中コルチゾール濃度が数回上下に変動したことによって，尿中コルチゾールレベルが血液中コルチゾール濃度を反映していることについて，より鮮明に示されたと考えられる．血漿中コルチゾール濃度のピーク値と尿中コルチゾールレベルのピーク値との時間差は約 0.5 時間であった．血漿中

コルチゾール濃度と尿中コルチゾールレベルの時間差は、ヒツジでは 2 時間 (Miller ら 1991) , ブタでは 1.5 時間と報告されており (Hay ら 2000) , 本試験ではそれらより早かった。一方, 尿中 17-OHCS レベルは, ACTH 投与による血漿中コルチゾール濃度の上昇に伴いその値は大きくなったが, 血漿中コルチゾール濃度は ACTH 投与後 2 時間以内に投与前のレベルに戻りそのまま維持するのに対し, ACTH 投与数時間後においても元のレベルに戻らなかった。また, 血漿中コルチゾール濃度のピーク値と尿中 17-OHCS レベルのピーク値との時間差も約 0.5 時間であった。

ACTH または生理食塩水を投与した時の血漿中コルチゾール濃度の反応の平均値を Table 2-2 に示した。投与 30 分前, 6 時間後および 36 時間後の血漿中コルチゾール濃度に ACTH 投与区と生理食塩水投与区で差はなかった。しかし, 投与 0-6 時間の反応曲線下面積は, ACTH 投与区で明らかに大きかった ($P < 0.01$) 。

Fig. 2-4 に, ACTH または生理食塩水を投与したのち 6 時間ごとに区切った時の, 尿中コルチゾールレベルおよび尿中 17-OHCS レベルの平均値を示した。ACTH 投与により, 投与後 0-6 時間後の尿中コルチゾールレベルは, それに続く他の時間よりも 4-10 倍高く, また, 生理食塩水投与 0-6 時間後と比較しても有意に高かった。ACTH 投与 0-6 時間後の尿中 17-OHCS レベルは, 投与 18-24 時間後および 24-30 時間後よりも有意に高かったが, 尿中コルチゾールレベルほど顕著ではなかった。尿中 17-OHCS は, コルチゾールの分泌異常を反映する検査としてヒトで利用されてきた (山田と関原 2010) 。ウシでは, 尿に含まれる内因性のコルチゾール代謝産物中に占める THF や THE の割合がヒトと比較し低いと言われているが (Pavlovic ら 2013) , 尿中コルチゾールレベルと尿中 17-OHCS レベルが同等の反応を示さなかったことについては不明である。

以上のことから、約 0.5 時間の差はあるものの、ウシにおいて尿中コルチゾールレベルは、血液中コルチゾール濃度の変化を非常によく反映しており、HPA 系の活性を見る時、尿は血液の代替として非侵襲的に採取できる生体試料であると考えられた。また、血液中コルチゾール濃度の代替としては、尿中 17-OHCS よりも、尿中コルチゾールを直接測定する方が優れていることが明らかとなった。

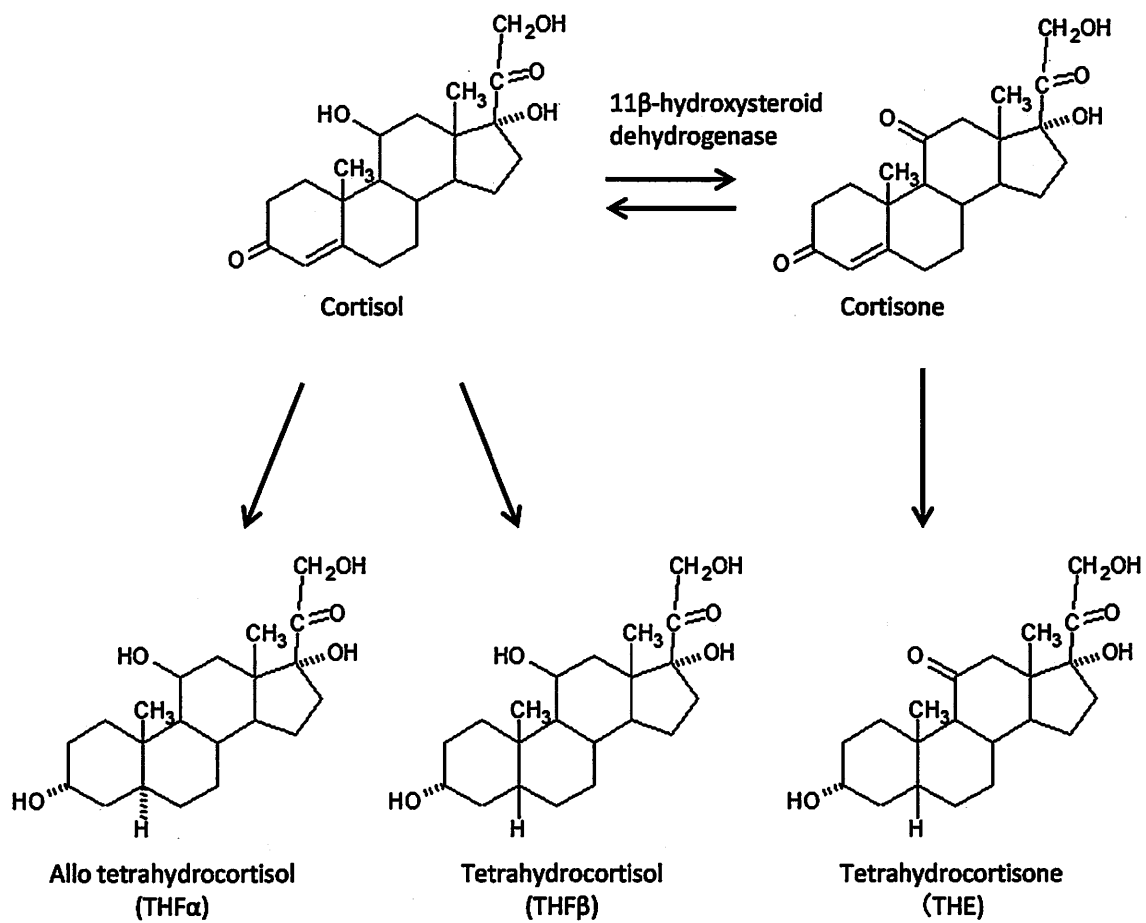


Fig. 2-1 Interconversion of cortisol/cortisone by 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase and formation of their A ring reduced metabolites

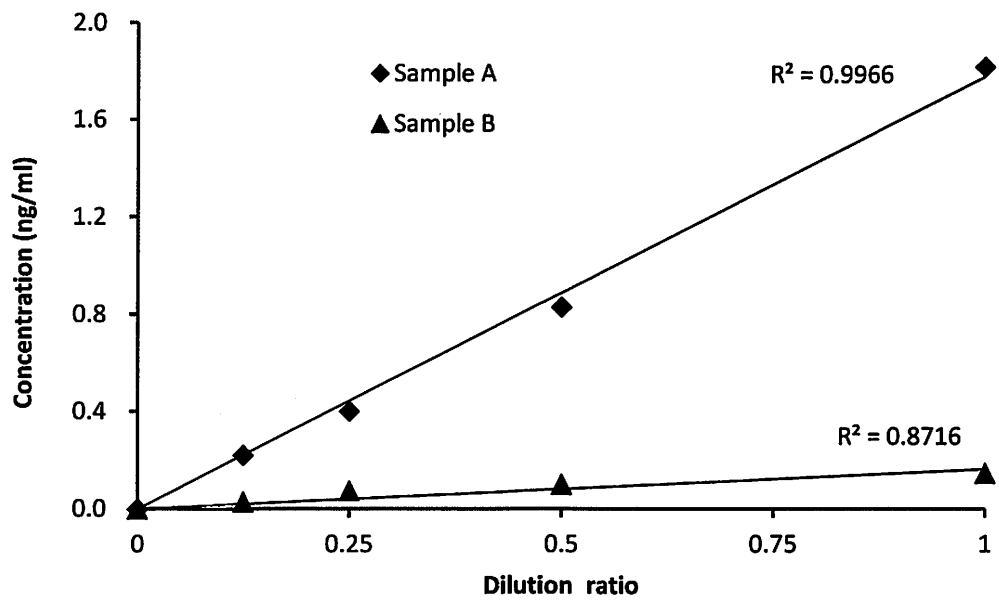


Fig. 2-2 Effect of serial dilution of urine samples on assay values of cortisol

Table 2-1 Analytical recovery of cortisol from urine

Sample	Added (ng/ml)	Observed (ng/ml)	Estimated (ng/ml)	Recovery (%)
Sample 1	0	0.829		
	0.3	1.056	1.123	94.1
	2	2.573	2.789	92.3
Sample 2	0	0.220		
	0.3	0.356	0.519	68.7
	2	1.818	2.209	82.3
Average				84.4

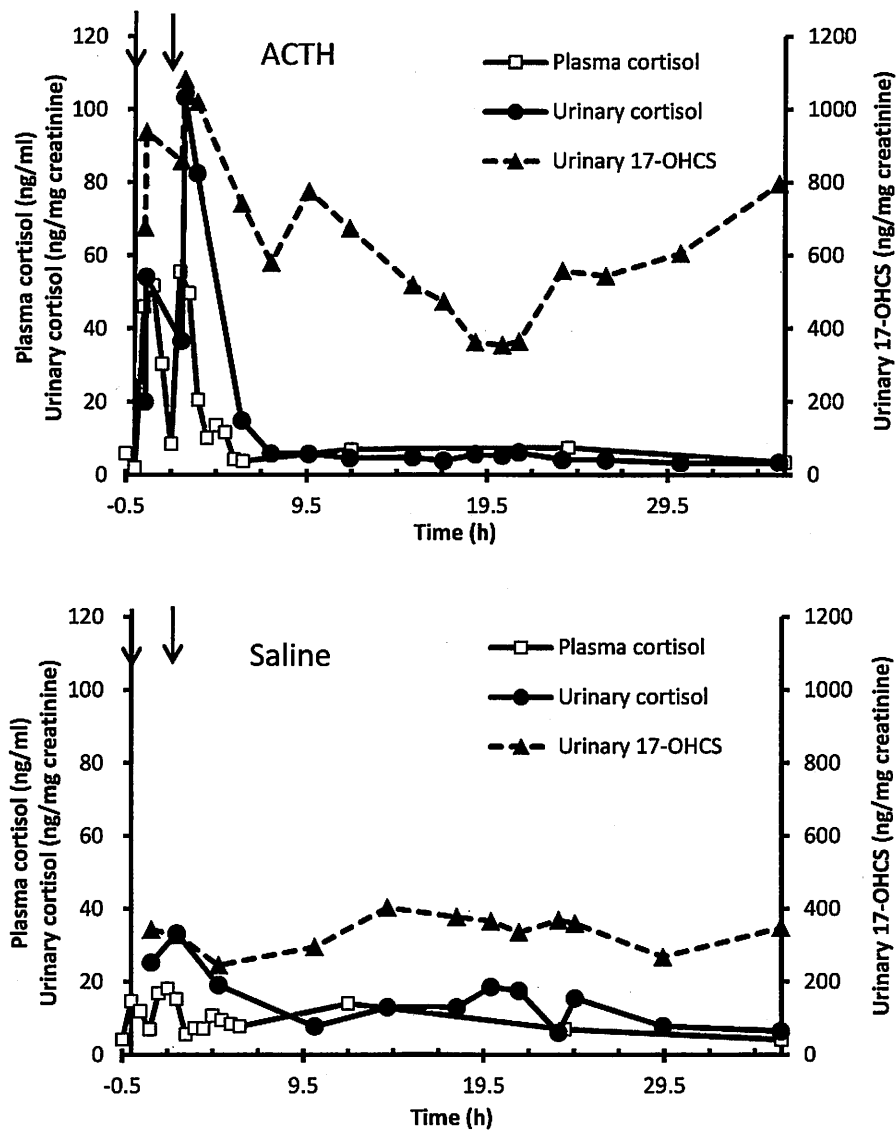


Fig. 2-3 Concentrations of plasma cortisol (open squares), urinary cortisol (closed circles), and urinary 17-OHCS (closed triangles) in a representative cow following the administration of ACTH or saline at time 0 and 2 h (indicated by arrows).

Table 2-2 Mean plasma cortisol concentrations and integrated adrenocortical responses following the administration of adrenocorticotrophic hormone (ACTH, n = 3) or saline (n = 3) to cattle[‡]

Item	ACTH	Saline
Cortisol (ng/ml)		
At -30 min	5.21 ± 1.191	4.1 ± 0.53
At 6 h	5.04 ± 1.85	5.82 ± 0.98
At 36 h	5.93 ± 3.22	7.77 ± 1.83
Integrated cortisol response (ng·min/ml [§])	8673 ± 570 ^a	2492 ± 729 ^b

[‡]Means ± standard errors.

[§]Area under the plasma cortisol concentration × time curve over 6 h.

^{a,b} Means within a row with different superscripts are significantly different ($P < 0.01$).

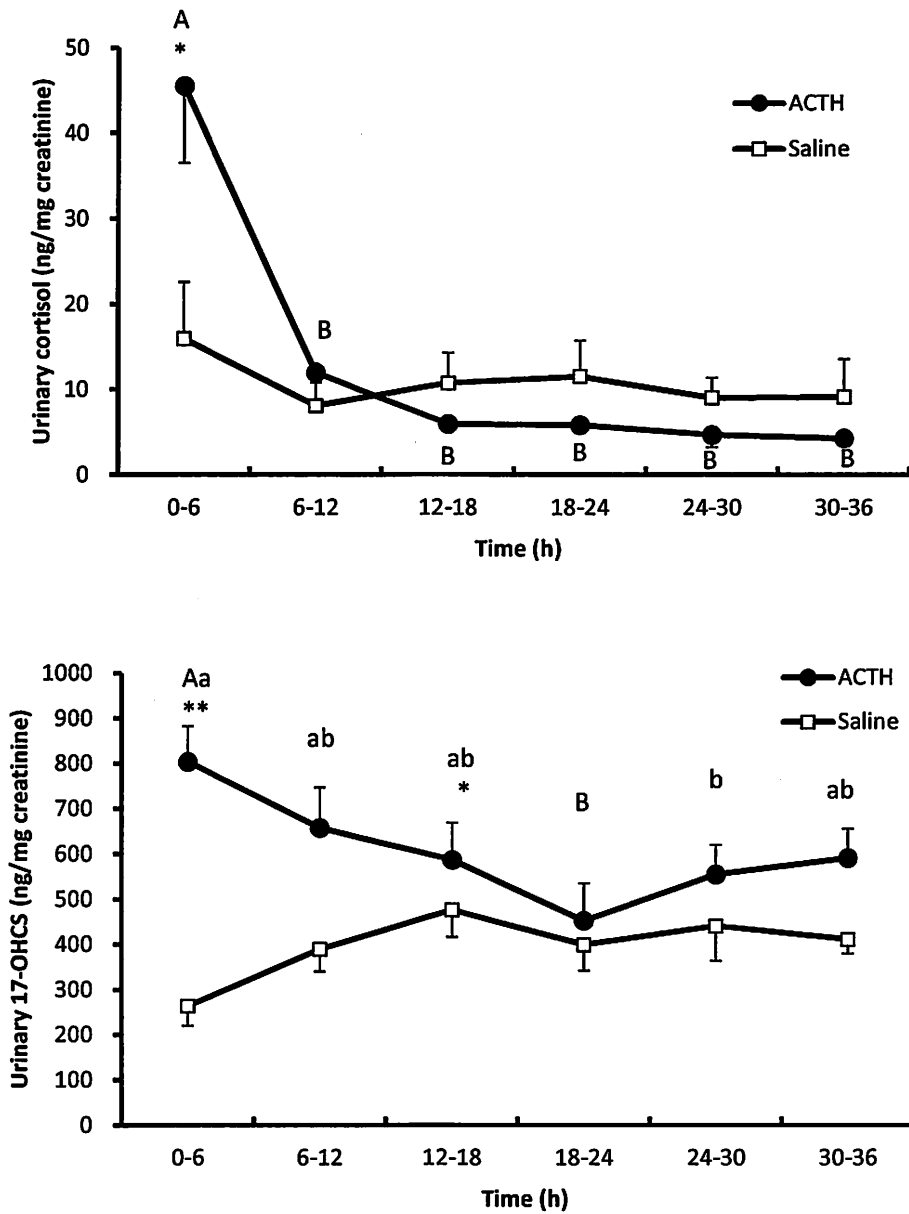


Fig. 2-4 Mean concentrations of urinary cortisol and urinary 17-OHCS during 6-h periods in cattle following the administration of ACTH (closed circles) or saline (open squares) at time 0 and 2 h. Values are means \pm standard errors. ^{A, B} ($P < 0.01$) and ^{a, b} ($P < 0.05$) indicate significant difference among times within the same treatment. ^{**} ($P < 0.01$) and ^{*} ($P > 0.05$) indicate significant difference between treatments within the same time.

2.2. 社会的隔離ストレスが尿中コルチゾールレベルに及ぼす影響

2.2.1. 緒言

生体がストレスに曝されると主に 2 つの系の反応が発現する。1 つは HPA 系であり, 1.1. や 2.1. で詳しく述べた。一方, もう 1 つの系である SMA 系では, Cannon (1932) のいう「闘争か逃走 (fight or flight)」反応に代表されるような緊急時に交感神経系が興奮し, 交感神経節前線維の神経終末からアセチルコリンが放出され, 副腎髄質から主にアドレナリン分泌が促進される。同時に, 交感神経節後線維からはノルアドレナリンが分泌される。神経終末から分泌されたノルアドレナリンの一部は循環血液中へと流入し, 全身に運ばれる。それらの結果, 血圧の上昇, 脈拍の増加, 血糖値の増加, 瞳孔の散大などの反応が生じる (樋口 2000)。循環血液中のカテコールアミンは, 代謝の過程で一部尿中へ排泄されるため (Payne ら 1992), 尿中カテコールアミンをストレス指標とした研究が, 家畜や動物園動物の分野では, ブタ (Hay と Mormede 1998; Hay ら 2000; Foury ら 2005), ゾウ (Dehnhard 2007), イヌ (堀井ら 2003), ヒツジ (Sasaki ら 1973; 大城ら 1978) などで報告されている。ウシでは, 尿中カテコールアミンと肉質の関係について (Lowe ら 2004; Muchenje ら 2009) や, 尿中カテコールアミンの品種間差 (O'Neill ら 2012) について報告されているが, それらの尿は屠畜時に採取したものであり, ウシの生存時における尿中カテコールアミンについては, Alvarez と Johnson (1970) と Nakamura と Nemoto (1992) による環境温度との関係についての報告があるのみで詳細は不明である。

ウシは群居性動物と言われており, 群れを形成する動物である (佐藤と近藤 2002)。ウシを 1 頭だけ隔離すると, 心拍の増加, 血漿中コルチゾール濃度の

上昇、鳴きの回数の増加がみられ、ウシにとって社会的隔離は明らかに厳しい精神的ストレスになると言われている (Hopster と Blokhuis 1994; Boissy と LeNeindre 1997 ; Rushen ら 1999) .

2.1.において、ウシに ACTH を投与し、血漿中コルチゾール濃度を人為的に高めると、尿中コルチゾールレベルは上昇することを述べた。しかし、実際のストレス負荷時における尿中コルチゾールレベルの変動についても確認する必要がある。そこで、ウシを社会的隔離させた時の尿中コルチゾールおよび尿中カテコールアミンについて調べ、それらがどのように変化するのかについて検討した。あわせて、尿中コルチゾールレベルと尿中カテコールアミンレベルの関係についても調べた。

2.2.2. 材料および方法

(1) 供試動物および試験方法

試験は東北農業研究センター内 (岩手県盛岡市) で行った。6頭の日本短角種雌牛 (平均体重 651 ± 42 kg) を供試した。それらを含む 14頭 (457-756 kg, 2-12才) を1群として牛舎で群飼し、それらは隣接する松林 (2.5 ha) に自由にアクセスできた (Fig. 2-5)。牛群は、1日2回、09:00と16:00に牛舎で給餌し、飼料は、1日1頭あたり濃厚飼料1kg、粗飼料として乾草を自由摂取させた。濃厚飼料は2.1.と同様のものであった。水は自由摂取させた。牛群は、給餌の時のみ牛舎にいたが、その他の時間帯は松林で過ごした。

試験牛は、1頭ずつ社会的に隔離した。すなわち電牧で松林へのアクセスを3日間禁じた。初日の隔離処理は8:30に開始した。その他のウシはすべて給餌と給餌の間は松林で過ごし、その間、試験牛の位置からは牛群は見えなかった。

試験牛の尿は、3日間の隔離処理期間中、1日1回、9:00以降の最初の排泄

物を採取したが、2.1.で尿中コルチゾールレベルの変動と血漿中コルチゾール濃度の変動には約 0.5 時間の時間差があることが確認されたため、初日のみ、隔離処理 2 時間後からの尿を採取した。各尿のうち 30ml をフィルターで濾過し不純物を取り除き、カテコールアミン用には 6N 塩酸を数滴加えて酸性化したものを準備し、分析まで-20℃で保存した。

(2) 分析方法

尿中コルチゾールおよび尿中カテコールアミンは、市販の EIA キットを用いて測定した (Oxford Biomedical Research, Inc., Oxford, MI, USA および Labor Diagnostika Nord, Nordhorn, Germany)。これらの尿中の値は尿の希釈率を補正するため、尿中のクレアチニン濃度に対する比で表した。クレアチニンは、Jaffe 法により測定した (クレアチニンテスト, 和光純薬, 大阪, 日本)。尿中コルチゾールレベルおよび尿中カテコールアミンレベルは、ng/mg クレアチニンを単位とした。

(3) 統計処理

尿中コルチゾールレベルおよび尿中カテコールアミンレベルは、SAS (Version 9.21; SAS Institute, Cary, NC, USA) の MIXED プロシジャを用い、個体を変量効果、採取日を母数効果とし、Scheffe の多重比較を行った。また、尿中コルチゾールレベルと尿中カテコールアミンレベルの相関は、SAS の CORR プロシジャを用いて解析した。

2.2.3. 結果および考察

尿中コルチゾールレベルおよび尿中アドレナリンレベルは、隔離前と比較し、隔離処理 1 日目で有意に上昇し ($P < 0.05$)、続く 2 日間では処理前のレベルに戻った (Fig. 2-6)。尿中ノルアドレナリンレベルは、採取日によりなんら

かの差がある傾向が見られたが ($P < 0.07$) , 多重比較による採取日間の明確な差は見られなかった。ウシにおいて短期の社会的隔離処理はコルチゾール分泌を増加させるが (Rushen ら 1999) , 社会的隔離処理が長期化するとその増加は見られなくなると言われている (Munksgaard と Simonsen 1996) 。このことから、社会的隔離に対する適応あるいはコルチゾール分泌のフィードバック機能が働いていると考えられている。本試験においても、尿中コルチゾールレベルの上昇が確認され、その上昇は一過性であった。

一方、コルチゾール分泌と異なり、家畜を対象としたストレス刺激時のカテコールアミンに関する研究は、循環血液中のカテコールアミンの分解が速くその測定が難しいこと、また、個体差が大きいことなどの理由から少ない (Minton 1994) 。しかし、300 kg 程度の子牛を 14 時間トラック輸送した時、血漿中アドレナリンおよびノルアドレナリン濃度は上昇したという報告 (Odore ら 2004) や、いわゆるヌレ子と呼ばれる哺乳子牛を 100 km 以上輸送すると血漿中ノルアドレナリン濃度は上昇したという報告 (Uetake ら 2011) は、ウシにおいてもストレスにより SAM 系が活性化されることを示している。また、雄ウシにおいて、屠畜前の扱われ方が屠畜後の尿中アドレナリンレベルを上昇させること (Lowe ら 2004) や、数品種の去勢牛において、屠畜後の尿中カテコールアミンレベルはその品種のストレス感受性を反映していること (Muchenje ら 2009) が報告されている。本試験の結果から、屠畜後だけではなく、生体においてもストレスにより尿中アドレナリンレベルが上昇することが明らかとなった。

Table2-3 に尿中ホルモン間の相関係数を示した。尿中コルチゾールレベルは、尿中アドレナリンレベルとの間に正の相関がある傾向が見られたが ($P < 0.08$) , 尿中ノルアドレナリンレベルとの間に相関は見られなかった。Foury ら (2005) は、屠畜後のブタの尿を調べ、尿中コルチゾールレベルと尿中アドレナリンレ

ベルの間には正の関係があり、それは、尿中コルチゾールレベルと尿中ノルアドレナリンレベルの正の関係よりも強いと報告しており、我々の結果と一部一致している。しかし彼らは、尿中アドレナリンレベルと尿中ノルアドレナリンレベルの間にも強い正の関係があると報告しているが、我々の試験では、尿中アドレナリンレベルと尿中ノルアドレナリンレベルの間に相関は見られなかった。Apple ら (1995) は、ヒツジを用い、拘束および社会的隔離ストレスは、血漿中コルチゾール濃度およびアドレナリン濃度を著しく上昇させるが、ノルアドレナリン濃度を変化させなかったと報告している。アドレナリンは、特に、精神的ストレスを反映し、一方、ノルアドレナリンは身体運動と関係があると言われている (Odore ら 2004)。また、Foury ら (2005) は、副腎皮質と副腎髄質は連携しながら生体内で機能するが、HPA 系と SAM 系は独立してそれぞれが働いていると述べている。これらのことが、本試験において、尿中コルチゾールレベルと尿中アドレナリンレベルとの間にのみ相関が見られたこととなんらかの関係あるのかもしれない。

以上のことから、日本短角種において、社会的隔離ストレスを負荷すると、一時的に尿中コルチゾールレベルおよび尿中アドレナリンレベルが上昇することが明らかとなった。尿中コルチゾールレベルは、人為的な HPA 系活性の高まりだけではなく、実際のストレス負荷にも反応して上昇することが明らかとなった。また、尿中コルチゾールレベルだけではなく、尿中アドレナリンレベルについても、非侵襲的なストレス指標となりうるということが、屠体だけではなく生体においても示された。隔離処理 1 日目において、尿中コルチゾールレベルは処理前と比較し 2.4 倍、尿中アドレナリンレベルは 2.7 倍の上昇でほぼ同程度であり、いずれも処理 2 日目には処理前レベルに戻ることから、どちらがより優れたストレス指標であるかについては断言できない結果であった。ただし、本試験で用いた分析キットは、カテコールアミン測定では測定前にアシル化が

必要など、コルチゾールの方が測定の手順が簡易であり、利用しやすいと考えられた。

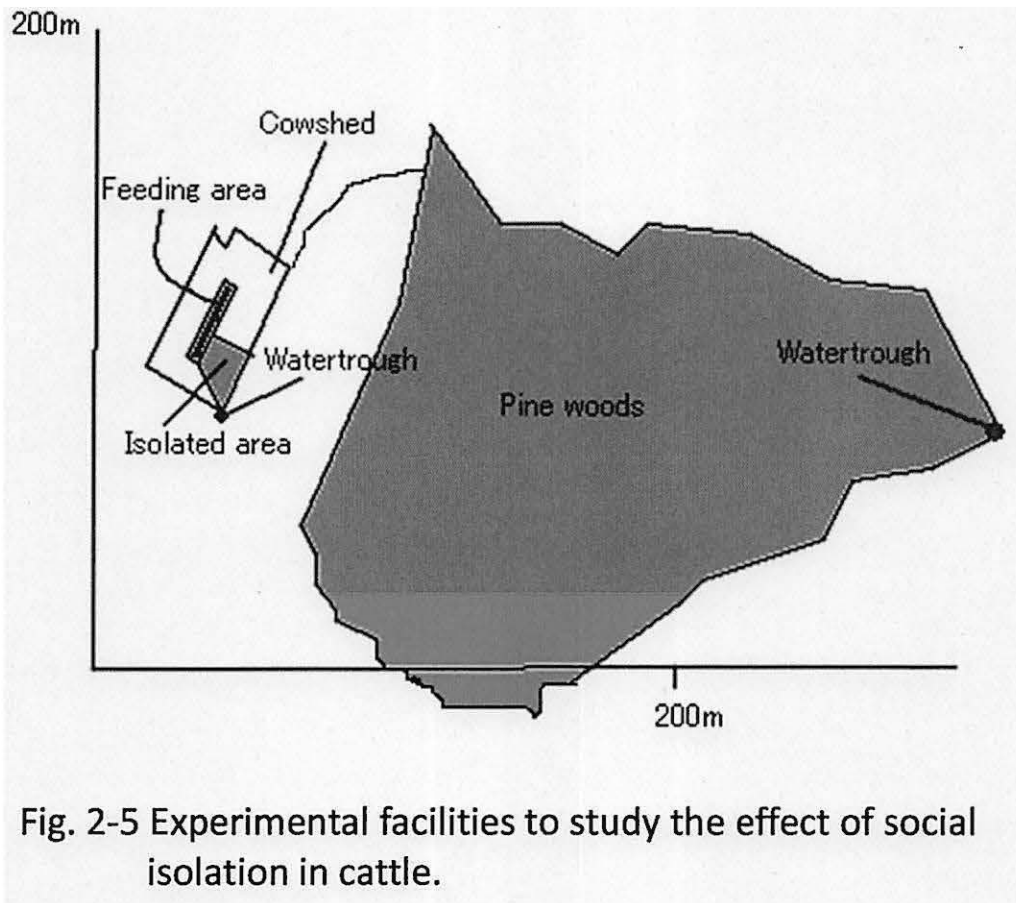


Fig. 2-5 Experimental facilities to study the effect of social isolation in cattle.

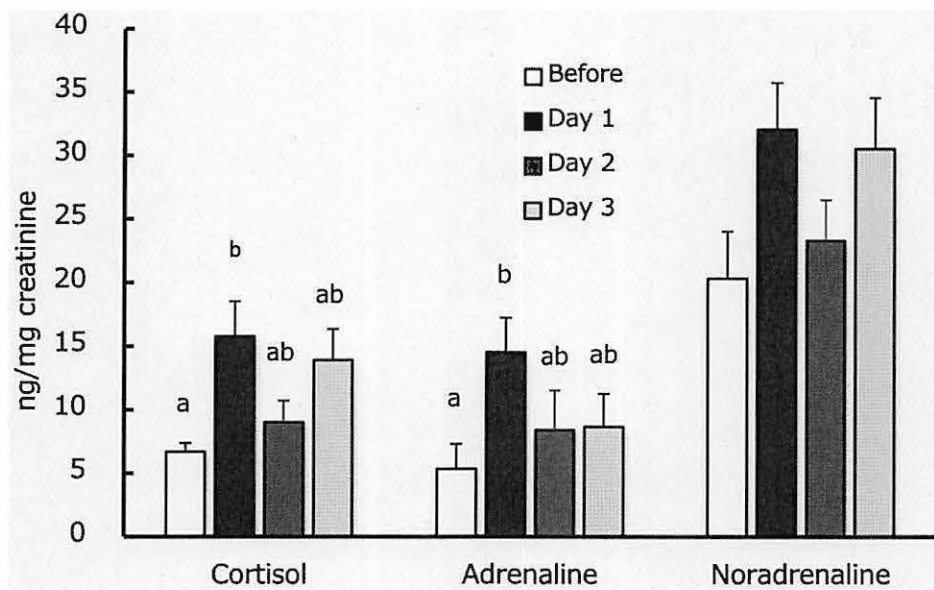


Fig. 2-6 Urinary cortisol and catecholamine levels before and after social isolation. Values are means \pm standard errors. Different letters indicates significant differences ($P < 0.05$).

Table 2-3 Correlation coefficient among urinary hormone levels in cows

	Adrenaline	Noradrenaline
Cortisol	0.375 [‡]	0.088
Adrenaline		0.173
Noradrenaline		

[‡]Approaching significance ($P < 0.08$)

2.3. 除角および去勢が尿中コルチゾールレベルに及ぼす影響

2.3.1. 緒言

多頭の群飼育の場合，その管理を円滑に行うために除角を実施することが多い。除角によって，順位争いによる角の突き合いによる損傷を減少させ，また，肉用牛では肉質を向上させるという報告がある（前原ら 1993）。

また，雄子牛は，多くの場合肉用牛として肥育されるが，去勢を施すことで，肉質が向上するとともに，管理者への危険が減少する（玉城ら 2006）。

このように，除角や去勢は産業上必要であり，一般的に行われる処置である。しかし，これらはウシにとって著しいストレスであることは容易に想像でき，実際，これらの処置により血漿中コルチゾール濃度は上昇する。除角による血漿中コルチゾール濃度の変化については多くの研究が報告されているが，Stafford と Mellor (2005) の総説によると，除角により，血漿中コルチゾール濃度は急速に上昇し，約 30 分で最高値に達し，その後，5-6 時間後には元のレベルに戻る。この一連の反応は，6 週齢の子牛でも，6 ヶ月齢の子牛でも大きくは変わらない。また，去勢によっても血漿中コルチゾール濃度は上昇するが，6 ヶ月齢よりも遅く処理すると，コルチゾール濃度はより上昇する（Bretschneider 2005）。本節では，除角や去勢といった処置によって血漿中コルチゾール濃度が上昇した時における，尿中コルチゾールレベルの変化について調査し，ストレス指標としての有効性について検討した。

2.3.2. 材料および方法

(1) 供試動物および試験方法

試験は東北農業研究センター内（盛岡市）で行った。日本短角種の雄子牛 3 頭（3 ヶ月齢，平均体重 131 ± 16.2 kg）と，雌子牛 3 頭（8 ヶ月齢，平均体重 195 ± 5.81 kg）を供試した。雄子牛には除角と去勢を実施し，除角と去勢の処置は 2 日間の間隔をあけた。雌子牛には除角の処置を行った。除角，去勢ともに無麻酔で実施した。除角は横臥位の保定後，除角器を使用し，焼烙により止血した。去勢は，横臥位の保定後，無血去勢器を用いて実施した。保定前の安静時に尿を採取し，処理前の試料とした。除角または去勢処理後 60 分以内に尿を採取し，除角または去勢時の試料とした。ただし，除角処理を施した 1 頭については，処理中の尿を試料とした。各尿をフィルターで濾過し不純物を取り除き，分析まで -20°C で保存した。

(2) 分析方法

尿中コルチゾールは，市販の EIA キットを用いて測定した（Oxford Biomedical Research, Inc., Oxford, MI, USA; Labor Diagnostika Nord, Nordhorn, Germany）。これらの尿中の値は尿の希釈率を補正するため，尿中のクレアチニン濃度に対する比で表した。クレアチニンは，Jaffe 法により測定した（クレアチニンテスト，和光純薬，大阪，日本）。尿中コルチゾールレベルは，ng/mg クレアチニンを単位とした。

(3) 統計処理

尿中コルチゾールレベルは，SAS（Version 9.21; SAS Institute, Cary, NC, USA）の MIXED プロシジャを用い，個体を変量効果，処理を母数効果とし，Scheffe の多重比較を行った。

2.3.3. 結果および考察

尿中コルチゾールレベルは、去勢によって有意に上昇し、また、除角によっても上昇する傾向が認められた (Fig. 2-7) . 除角や去勢により、血漿中コルチゾール濃度は処置後約 30 分で最高値に達する (Molony ら 1995) . 2.1.において、尿中コルチゾールレベルは、血漿中コルチゾール濃度の変化と、30 分程度の遅れをともなって同様に变化することを確認した. よって、処置後約 60 分後の尿中にコルチゾールが多量に含まれると考えられ、本試験で行った試料採取は、1 頭の供試牛については除角処理中に尿を採取したことも含め、若干早かったかもしれない. しかし、それらの作業は横臥位の保定という処置を伴うため、本試験で得られた試料は、保定を含めたストレスに曝された試料であると考えられた. 除角処理前の、保定枠への拘束のみのストレスに対しても血漿中コルチゾール濃度は上昇するという報告がある (Wohlt ら 1994) 従って、本試験からは、なんらかの身体的 (および精神的) ストレスが負荷され、血漿中コルチゾール濃度が上昇する時には、尿中コルチゾールレベルも上昇することが明らかとなった.

除角や去勢は、産業上必要で回避できない処置であるため、その際のウシへの負担を少しでも減らそうと様々な研究が行われている. 例えば鎮痛剤、抗炎症薬、局所麻酔薬の使用や (Stafford と Mellor 2005) , 超早期での実施 (白尾 2000; Bretschneider 2005) などにより、ストレス低減を試みている. その際、多くの研究では血液中コルチゾール濃度でウシのストレスレベルを評価しているが、尿中コルチゾールレベルに代えることによって、より簡易に、かつ採血によるストレスを排除した上でストレスレベルを評価できるものと考えられる.

以上のことから、少なくとも身体的ストレスを受けたときのストレス指

標として、尿中コルチゾールレベルは有効であることが確認された。

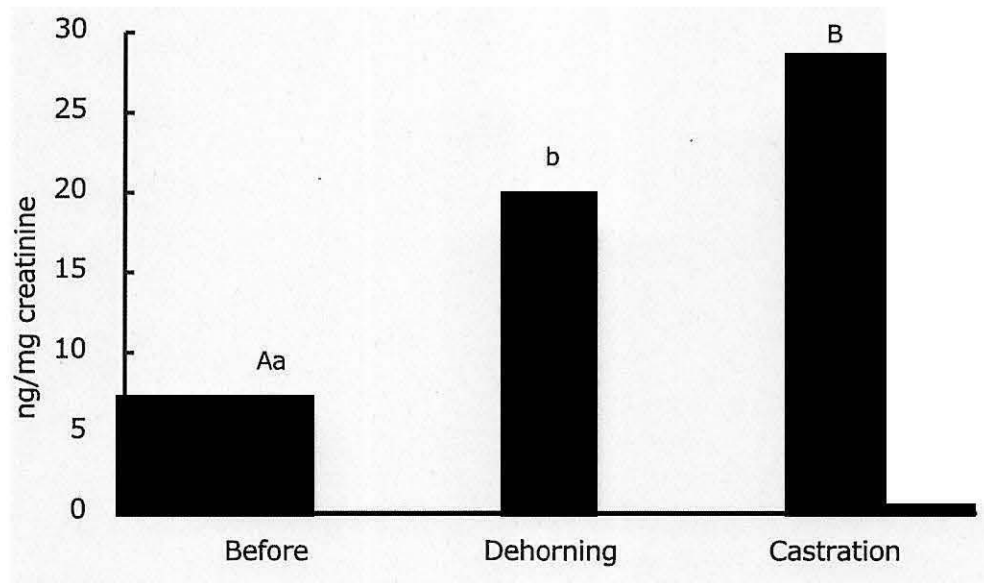


Fig. 2-7 Urinary cortisol levels before and after dehorning and castration. Values are means \pm standard errors. Different letters indicates significant differences ($A, B P < 0.05$; $a, b P < 0.1$).

2.4. 小括

本章では，ウシにおいて，スポット尿を用いた尿中コルチゾールレベルが，ストレス指標として利用可能かについて検討した．その結果，ウシに ACTH を投与することにより，人為的に血漿中コルチゾール濃度を高めると，尿中クレアチニンに対する比で表した尿中コルチゾールレベルも同様に高まり，時間の経過とともに血漿中コルチゾール濃度が低下すると，尿中コルチゾールレベルも同様に低下した．このように，尿中コルチゾールレベルは，血漿中コルチゾール濃度の変化を非常によく反映していた．尿は，血液と異なり，ウシに対し，その採取が非侵襲的かつ簡易に行え，採取自体がストレスナーになりうる危険性は少ない．これらのことから，尿中コルチゾールレベルは血液中コルチゾール濃度の代用として利用が可能であると判断するとともに，その採取に負荷がかからないため，血液よりもむしろ正確なストレス指標になりうるかもしれない．次に，精神的ストレスナーとして社会的隔離処置を施した時，および，身体的ストレスナーとして除角や去勢処置を施した時における，尿中コルチゾールレベルについて調査した．その結果，いずれのストレスナーに対しても，尿中コルチゾールレベルは上昇した．以上のことから，尿中コルチゾールレベルは，ウシにとってストレス指標として有効であることが明らかとなった．そのほかに，尿中 17-OHCS およびカテコールアミンについても同様に検討したが，血漿中コルチゾール濃度への反映精度や，測定の複雑さから，尿中コルチゾールの方が優れた指標であると考えられた．

第3章 飼育方式がウシのストレスレベルに及ぼす影響

我が国の畜産は、肉用牛、乳用牛ともに、その飼育は牛舎内で集約的に行われ、給与飼料の大部分は海外からの輸入に頼っているのが現状である。しかし、著しい飼料自給率の低下や口蹄疫の発生などから、輸入飼料に依存しない安心安全な畜産を目指して、農林水産省は「酪農及び肉用牛生産の近代化を図るための基本方針」を策定し、その中で放牧を推進している（農林水産省 2010）。わが国では、放牧はこれまで衰退の一途をたどってきたが、この 10 年間で放牧を取り入れる農家の割合は 1.5~2 倍に増加している。

昨今の畜産業界では、世界的にアニマルウェルフェアに対する取り組みが行われている。家畜におけるアニマルウェルフェアとは、「飢えと渇きからの自由」、「不快からの自由」、「痛み、傷、病気からの自由」、「通常行動への自由」、「恐怖や悲しみからの自由」の 5 つの自由を保証してやることであり、家畜をよりストレスが少なく彼らの本来の性質を尊重する方法で飼育することを意味する（佐藤, 2013）。このようなアニマルウェルフェアの視点からも、放牧は優れた飼育方式だと一般的に思われている。例えば、ドイツ圏で福祉の指標とされている Animal Needs Index (ANI2000) では、放牧時間が多いほどウェルフェアスコアは高く評価される（瀬尾 2010; 近藤 2013）。また、放牧では乳房炎（Washburn ら 2002）や跛行（Hernandez-Mendo ら 2007）といった疾病が少ないとも言われている。しかし、放牧牛は気象環境の影響や小型ピロプラズマ病の発病リスクなど、その飼育環境は非常に厳しいのも事実である。放牧牛のストレスを客観的にとらえ評価できれば、アニマルウェルフェア研究の一助になると同時に、わが国における放牧の普及にもつながると考えられる。

そこで本章では、放牧および舎飼い飼育下におけるストレスレベルを調査し、

比較検討した。ストレス指標としてのコルチゾールは、血液中の濃度を測定するのが一般的であるが、放牧牛ではヒトとの関係が希薄になりがちなことから、採血行為自体が極度のストレッサーとなり、血液中コルチゾール濃度をストレス指標として用いることは難しい。血液中コルチゾール濃度に代わって、尿中クレアチニンに対する比で表した尿中コルチゾールレベルがストレス指標となり得ることを第2章で確認できたことから、本章においても尿中コルチゾールレベルをストレス指標として用いた。対象牛は日本短角種およびホルスタイン種とした。日本短角種は、北海道および北東北で飼育され、放牧適正があると言われている品種である。一方ホルスタイン種は、乳用牛として世界で最も一般的な品種であるが、暑熱に弱い。そのような特徴のある2品種では、飼育方式に対する尿中コルチゾールレベルの反応が異なった。そこで最後に、この2品種間で飼育方式や暑熱に対する尿中コルチゾールレベルについて比較し、尿中コルチゾールレベルとそれぞれの品種の特徴との関連について考察した。

3.1. 飼育方式が日本短角種における尿中コルチゾールレベルに及ぼす影響

3.1.1. 緒言

放牧されたウシは、より自然な行動パターンを発現しやすい環境にあると言われており (Hemsworth ら 1995) , 舎飼い飼育下と放牧飼育下で、ウシの行動を比較した研究がいくつか報告されている。Krohn ら (1992) は、年間を通じて、ウシは数時間は外で過ごすことを好み、特に夏は牛舎内で TMR を摂取するよりも放牧地で生草を摂取する方を好むと報告している。また、舎飼い飼育下のウシは、放牧飼育下のウシよりも休息時間が短く (Oconnell ら 1989) , 牛舎でつなぎ飼いされていたウシを放牧すると常同行動の発現頻度が減少した (Redbo 1990) という報告もある。これらの報告では、行動学的側面から、放牧は舎飼いと比較しウシにとってストレスは少ないだろうと結論づけている。

一方、生理学的側面から、放牧と舎飼いを比較した研究は進んでいない。Redbo (1993) は、放牧されているウシを牛舎でつなぎ飼いすると、その後 1 週間はコルチゾール分泌の上昇が認められたことから、つなぎ飼いはウシにとってストレスになり得ると考察している。しかしこの研究では、逆のパターンである牛舎から放牧へと飼育環境を変化させた検討が行われておらず、コルチゾールの上昇は、単に、飼育環境が変わったことに起因する可能性も否定できない。

そこで試験 1 では、放牧から舎飼い、あるいはその逆の飼育環境の変化が、コルチゾール分泌にどのように影響を及ぼすかについて調査し、あわせて行動調査も行い、放牧と舎飼いでどちらがウシにとってストレスになるのかについて検討した。ウシは、反芻時には伏臥姿勢を好み (Ruckebusch と Bueno 1978) , 反芻時における起立姿勢の増加は不快性と何らかの関係があると言われている

(Osterman と Redbo 2001) . これらのことから、反芻時の伏臥率を行動学的ストレス指標として調査した。さらに試験 2 では、実際の春の放牧開始前後におけるコルチゾール分泌について調査し、実験的ではなく実際に起こりうる状況下における検討も加えた。

3.1.2. 材料および方法

(1) 供試動物および試験方法

試験は東北農業研究センター内（岩手県盛岡市）で行った。

(ア) 試験 1

日本短角種経産牛 7 頭（平均体重 632 ± 39 kg）を供試した。供試牛はすべて放牧および舎飼い経験はあるが、つなぎ飼いは未経験だった。供試牛を含む牛群は、2004 年 4 月 27 日に放牧地に出された。供試牛は、施設の関係から 2 つのグループに分け、4 頭は 2004 年 6 月 2 日に、残り 3 頭は 2004 年 7 月 7 日に、それぞれ放牧地から牛舎へと飼育環境を変え、4 週間後に再び放牧地に戻した。放牧地から牛舎へと飼育環境を変える 2 週間前から、牛舎から放牧地へと戻した 4 週間後までを試験期間とした。放牧地は、全部で 4 ha あり、第一優占草種はケンタッキーブルーグラス (*Poa pratensis* L.) であった。放牧地では、供試牛は他の非供試牛と一緒に牧区に放牧され、放牧密度は約 3.6 頭/ha であった。補助飼料は給与されなかった。牛舎では、供試牛は約 1 m のロープあるいは鎖でつなぎ飼いされた。供試牛は一列に並び隣の牛との間隔は約 1 m であった。隣のウシとの間に仕切りはなく、接触は可能だった。牛床にはもみ殻をしき、毎日交換した。飼料は残飼が少量生じる程度の乾草を 09:00 と 16:00 の 1 日 2 回、等量を給与した。水と鉱塩は各供試牛の前に配置し、不断給餌した。供試牛からのスポット尿は、飼育環境を変えた後 5 日間は毎日採取し、加えて、

試験期間中 1 週間ごとに 1 回採取した。スポット尿は、8:30 以降最初の排泄物を採取した。各尿のうち 30ml をフィルターで濾過し不純物を取り除き、分析まで-20℃で保存した。

(イ) 試験 2

日本短角種経産牛 6 頭 (平均体重 653±20 kg) を供試した。供試牛は、他の非供試牛とともに冬季は牛舎で飼育され、2003 年 5 月 1 日に放牧を開始した。放牧開始 2 週間前から開始 4 週間後までを試験期間とした。放牧地は試験 1 と同様であった。牛舎では群飼とし、隣接する松林 (2.5 ha) への移動が可能だった。飼料は、1 頭あたり 1 日につき配合飼料 1 kg と乾草 12.5 kgDM を 09:00 と 15:30 に等量与えた。水と鉱塩は不断給餌した。供試牛からのスポット尿は放牧開始日を 0 日とし、-14, -7, -6, -3, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 14, 21, 28 日目に採取した。採取後の取り扱いは試験 1 と同様とした。体重は毎週測定した。

(2) 尿採取および分析

尿中コルチゾールは、市販の EIA キットを用いて測定した (Oxford Biomedical Research, Inc., Oxford, MI, USA)。尿中コルチゾールは、尿の希釈率を補正するため、尿中のクレアチニン濃度に対する比で表した。クレアチニンは、Jaffe 法により測定した (クレアチニンテスト, 和光純薬, 大阪, 日本)。尿中コルチゾールレベルは、ng/mg クレアチニンを単位とした。

(3) 行動調査

試験 1 においては行動調査を実施した。試験期間中 1 週間ごとに 1 回、13:00 から 17:00 の 4 時間、4 分おきのタイムサンプリングにより実施した。すなわち、1 セッションにつき 1 頭あたり 60 の観測データを得た。1 人の観測者が、供試牛の姿勢 (起立あるいは伏臥) および行動 (採食, 反芻, 飲水, 自己なめ, 社会行動あるいはその他) を同時に観測し記録した。総反芻時間のうち、伏臥

姿勢での反芻時間の割合を算出し、反芻時の伏臥率とした。

(4) 統計処理

行動調査から得られた反芻時の伏臥率データについては逆正弦変換した後、尿中コルチゾールレベルおよび体重とともに、SAS (Version 9.21; SAS Institute, Cary, NC, USA) の MIXED プロシジャを用いて解析した。試験 1 においては、個体を変数効果、グループ、行動調査日または尿採取日、およびそれらの交互作用を母数効果として解析した。試験 2 においては、個体を変数効果、体重測定日を母数効果として解析した。飼育方式の影響については、CONTRAST ステートメントを用い、Scheffe の多重比較の基準に従い解析した。

3.1.3. 結果および考察

試験 1 において、尿中コルチゾールレベルは、グループと尿採取日の交互作用に有意性はなかったため ($P < 0.31$)、グループをまとめて解析した。放牧地から牛舎へと飼育方式を変化させたとき、尿中コルチゾールレベルは、変化前と比較し、1 日目において約 3.4 倍上昇した (Fig. 3-1)。その後、1 週間は高レベルを維持し、放牧時の値と比較し有意に高かったが ($P < 0.01$)、2 週目には牛舎飼育前のレベルにまで低下し、続く牛舎飼育期間中はそのまま維持した。このことから、放牧地から牛舎という飼育方式の変化は HPA 系を活性化すると考えられた。ただし、本試験の供試牛は、これまでに牛舎でのつなぎ飼いを経験したことがなく、このこともコルチゾールの上昇に一部影響を及ぼしていると考えられる。本試験結果は、放牧しているウシを牛舎でつなぎ飼いとすると、最初の 1 週間はコルチゾールの分泌量は上昇したがその後は減少したという Redbo (1993) の報告と一致する。ウシにおいて、つなぎ飼いや横臥制限が長期にわたると、コルチゾール濃度は一時的に上昇するがその上昇は持続

しない (Ladewig と Smidt 1989; Munksgaard と Simonsen 1996) ことから、コルチゾール分泌のフィードバック機能や、新規環境に対する適応の存在が指摘されており、本試験においても同様のことが考えられた。

一方、牛舎から放牧地へと飼育方式を変化させたときは、尿中コルチゾールレベルの変化は見られなかった。このことから、ウシにとって、放牧から牛舎でのつなぎ飼いという飼育方式の変化は、逆の、牛舎でのつなぎ飼いから放牧という変化よりも、一時的にせよ HPA 系の活性を高めるということが明らかとなった。

試験 1 の期間中、異物なめや舌遊び行動といった異常行動は見られなかった。反芻時の伏臥率は、グループと行動調査日の交互作用が有意であったが ($P < 0.01$)、各グループ内の結果は同様の傾向にあったためまとめて表した (Fig. 3-2)。反芻時の伏臥率は、放牧地から牛舎へと飼養環境を変えると大きく下がり、舎飼い期間中は低いまま維持した。牛舎から放牧地へと飼育環境を変えると反芻時の伏臥率は牛舎飼育前のレベルに戻った。これらのことから、ウシにとって、牛舎でのつなぎ飼いは放牧よりも不快だったと考えられる。また、Ladewig と Smidt (1989) や Redbo (1993) の考察と同様に、本試験からも、行動学的指標は、長期的あるいは繰り返されるストレスに対し、生理学的指標よりも、反応が強く現れると考えられた。

試験 2 において、春の放牧開始前後に尿中コルチゾールレベルの変化は認められなかった (Fig. 3-3)。このことは、試験 1 において、牛舎から放牧へと飼育方式を変えたときに尿中コルチゾールレベルは変化しなかったことと一致する。しかし試験 1 の牛舎環境はつなぎ飼いであり、試験 2 では隣接する松林への移動も可能な群飼、と、試験 1 と 2 では牛舎での自由度に大きな違いがあった。Redbo (1990) は、常同行動は、放牧前の舎飼いよりも、放牧後の舎飼いで増加すると報告している。このことから、ウシにとっては、「放牧の前」

よりも、「放牧の後」がストレスで、試験 1 と 2 の放牧前の牛舎環境の違いによる影響は少なかったと考えられる。一方、体重は放牧開始後増加し、放牧開始 33 日目には、放牧開始 0 日と比較しその増加は有意だった ($P < 0.01$)。一般的に、ウシを放牧すると、開始直後はボディコンディションスコアや体重は減少すると言われている (Washburn ら 2002; Hernandez-Mendo ら 2007)。本試験では供試牛として日本短角種を用いたが、日本短角種は、伝統的に夏山冬里方式で飼育されてきた品種で、放牧に適していると言われており (高安 1983)、本試験でも放牧開始直後から体重増加が見られた。このことから、本試験で見られた、放牧から牛舎へと飼育方式を変えたことによる尿中コルチゾールレベルの上昇は、放牧適性がある日本短角種に限って見られる現象である可能性も否定できず、他の品種でも検討する必要性が生じた。

以上のことからまとめると、日本短角種において、放牧から牛舎でのつなぎ飼いへと飼育方式を変えると、尿中コルチゾールレベルは上昇したが、牛舎でのつなぎ飼いから放牧に変えると尿中コルチゾールレベルは変化しなかった。また、牛舎よりも放牧の方が反芻時の伏臥率も高かったことから、日本短角種においては、牛舎よりも放牧という飼育方式の方がストレスが少ないことが示唆された。

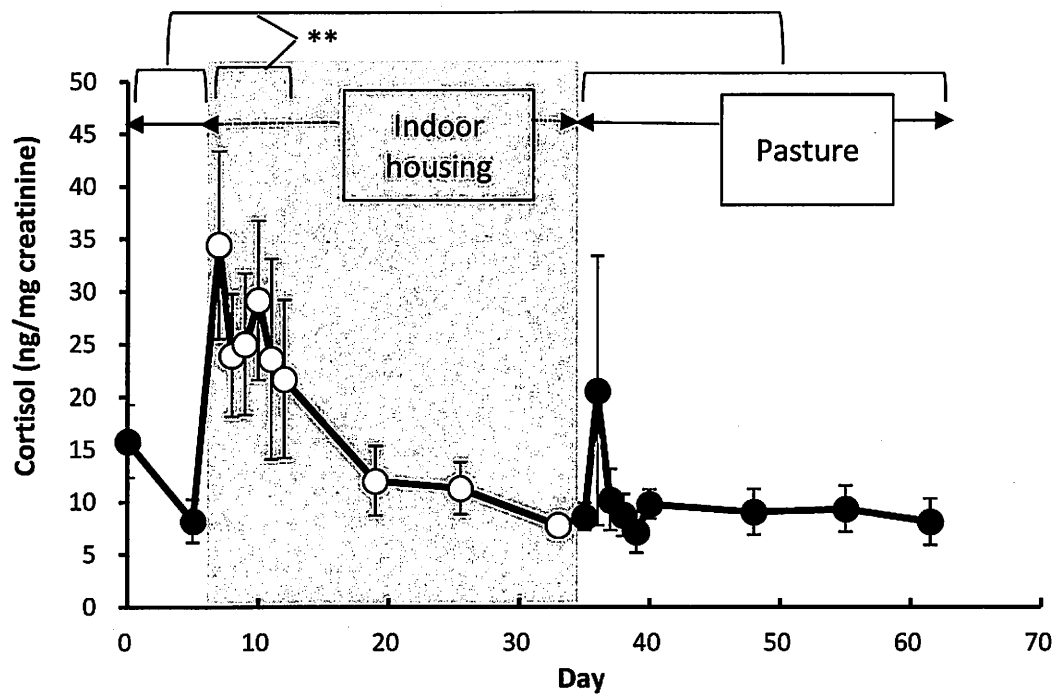


Fig. 3-1 Urinary cortisol levels of cows under indoor housing (open circles) and pasture (closed circles). Values are means \pm standard errors. ** indicates significant differences ($P < 0.01$).

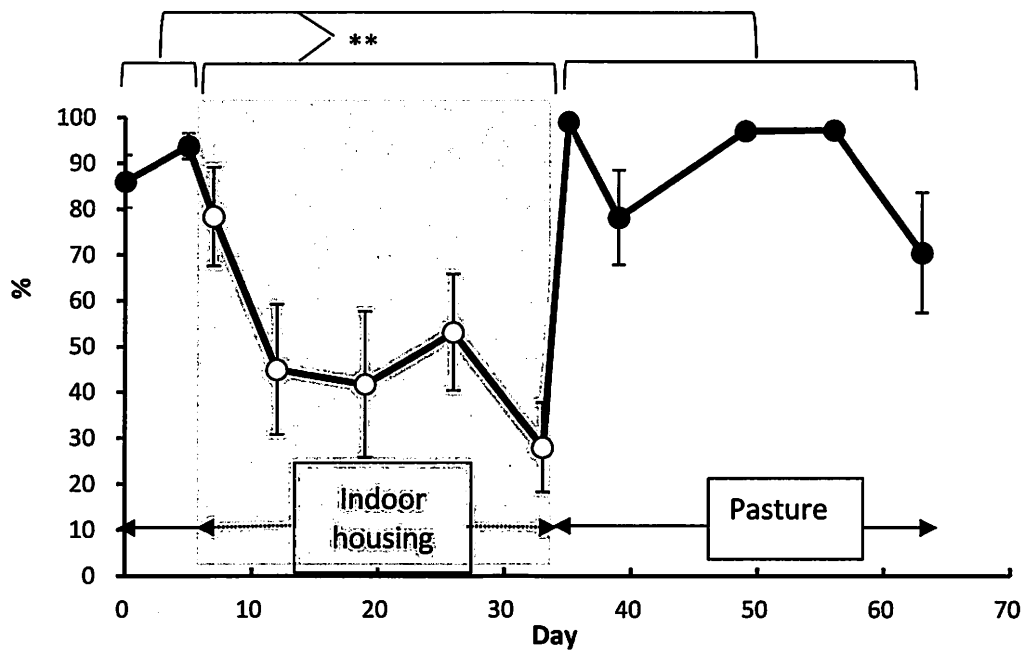


Fig. 3-2 Ratio of lying down while ruminating for cows under indoor housing (open circles) and pasture (closed circles). Values are means \pm standard errors. ** indicates significant differences ($P < 0.01$).

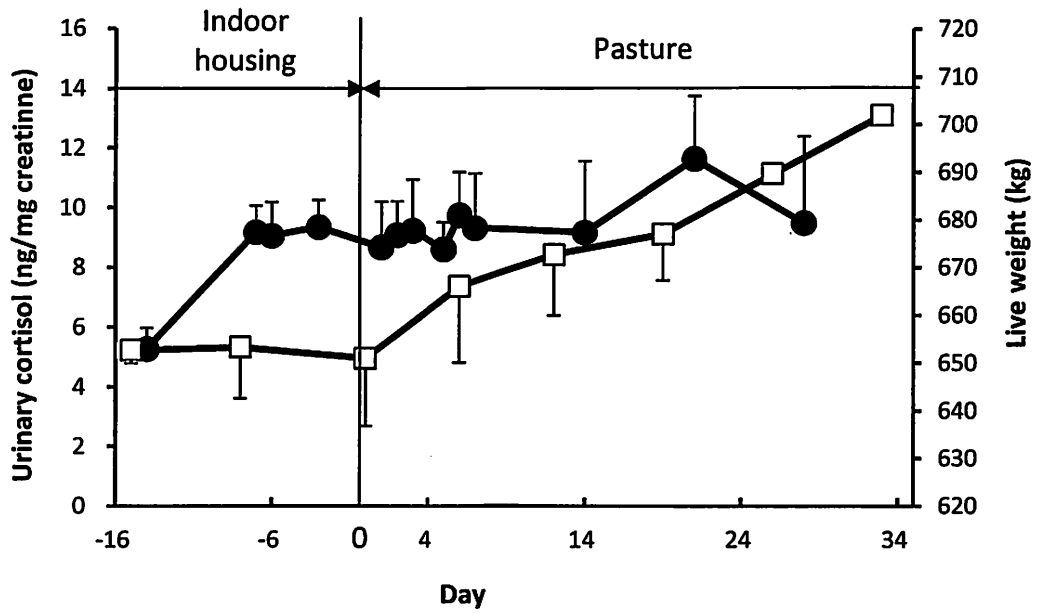


Fig. 3-3 Urinary cortisol levels (closed circles) and live weight (open square) before and after the start of the grazing season. Values are means \pm standard errors. Day 0 indicates the start of the grazing.

3.2. 飼育方式がホルスタイン種における尿中コルチゾールレベルに及ぼす影響

3.2.1. 緒言

3.1.において、日本短角種では、放牧よりも牛舎の方がストレスの多い飼育方式であることを、一時的な尿中コルチゾールレベルの上昇および持続的な反芻時の伏臥率の低下から明らかにした。

一方、牛舎では、ウシは高品質の飼料摂取が可能であり、雨風を防げるといったメリットもある。Legrandら（2009）は、ホルスタイン種泌乳牛を用いて放牧地と牛舎の選択試験を行い、ウシは特に温湿度指数（THI）が高いと日中は牛舎で過ごすことを選択したと報告している。また、Charltonら（2011b）は、降雨や乳量によって反応は異なるが、ホルスタイン種泌乳牛を用いて放牧地と牛舎の選択試験を行った結果、放牧地および牛舎の選択率がそれぞれ 8% および 92% だったと報告している。

ホルスタイン種は、ジャージー種やブラーマン種と比較して特に暑熱に弱い品種であり（Garcia-Penicheら 2005）、加えて、泌乳期は特に暑熱に対する感受性が高いと言われている（Hemsworthら 1995）。我が国は温暖湿潤気候帯に位置するが、昨今の夏季の猛暑は全国レベルで著しい（日本気象協会 2013）。これらのことから、ホルスタイン種泌乳牛にとって、夏季の放牧はむしろストレスになり得る可能性も否定できない。

そこで、ホルスタイン種泌乳牛において、3.1.とほぼ同様に、舎飼いから放牧、あるいはその逆の飼育方式の変化が尿中コルチゾールレベルに及ぼす影響を調べ、放牧と舎飼いでどちらがストレスになるのかについて、特に夏季の放牧に焦点をあて検討した。また、起立および伏臥動作は、ウシにおいて飼育環

境のウェルフェアを評価する際のよい行動学的指標と考えられている (Lidfors 1989) ことから, 本試験において, 放牧および舎飼い飼育下において, これらの動作に要する時間を調査した. 飼育方式の急変によるダメージを避けるため, 飼育方式の移行時それぞれに 1 週間の馴致期間を設けた.

3.2.2. 材料および方法

(1) 供試動物および試験方法

試験は東北農業研究センター内 (岩手県盛岡市) で行った. 泌乳中期のホルスタイン種泌乳牛 16 頭 (平均体重 605 ± 19 kg; 日平均乳量 25.3 ± 1.5 kg) を供試した. 供試牛は, 試験前には他のホルスタイン種泌乳牛とともに, 1 年を通じてパドック付きの牛舎で, 後述する舎飼い期と同様に飼育されていた. 搾乳時間は 06:00 と 16:30 の 1 日 2 回であった. 水と鉱塩は自由摂取とした.

試験は 2 年間に 3 回に分けて行った. 1 回目の試験 (Period 1) では, 放牧経験のない 5 頭を供試した. 2 回目の試験 (Period 2) では放牧経験のない 3 頭を供試した. 3 回目の試験 (Period 3) では, 放牧経験のある 6 頭と, 放牧経験のない 2 頭の計 8 頭を供試した. 供試牛は, 牛舎から放牧地へと飼育方式を変え, 3 週間放牧した後牛舎へ戻した. 飼育方式の切り替え時には, 1 週間の馴致期間を設けた. 各 Period は 9 週に渡る 5 つの期間から成り立っている. すなわち, 試験開始直前期 (1 週間), 放牧馴致期 (1 週間; 放牧馴致開始日を 0 日とする), 放牧期 (3 週間), 舎飼い馴致期 (1 週間), 舎飼い期 (3 週間) である. Period 1, 2, および 3 の放牧期はそれぞれ 2008 年 6 月 30 日, 2008 年 9 月 8 日および 2009 年 8 月 3 日に開始した (Fig. 3-4)

放牧期は, 搾乳および配合飼料給与時以外は昼夜放牧とした. 配合飼料 (可消化養分総量 [TDN] 79.9% [乾物中], 粗タンパク質 [CP] 14.0% [乾物中])

は、日本飼養標準・乳牛（1999）に従い各搾乳前に牛舎で給与した。第一優占草種がオーチャードグラス（*Dactylis glomerata* L.）である放牧地（1 ha）は電気牧柵で5つの区画に分け、1牧区あたり2-3日の輪換放牧を行った。放牧地には5×5 mの庇陰場所を設置した。また、放牧地に沿って松の木が植えられており、ウシはその木陰を利用できた（Fig. 3-5）。放牧地には供試牛のみ放牧した。水飲み場は庇陰場所近くに設置した。放牧地と牛舎は約110m離れており小道でつながっていた。

舎飼い期では、ウシは約1 mの鎖でつなぎ飼いされた。朝の搾乳後2時間および夕方の搾乳前3.5時間の計5.5時間は、隣接するパドックに非供試牛とともに放たれた。その間に牛床を清掃し敷料のおがくずを交換した。配合飼料（TDN80.2% [乾物中]，CP62.2% [乾物中]）およびオーチャードグラス乾草（TDN62.% [乾物中]，CP11.9% [乾物中]）を日本飼養標準・乳牛（1999）に従って給与した。

放牧馴致期では、最初の3日間は、ウシは朝の搾乳後から13:00まで放牧され、続く4日間は朝の搾乳後から夕方の搾乳前まで放牧された。それ以外の時間帯は舎飼い期と同様とした。一方、舎飼い馴致期では、最初の3日間は朝の搾乳後から13:00まで舎飼い期と同様に牛舎で飼育し、続く4日間は朝の搾乳後から夕方の搾乳前まで牛舎で飼育した。それ以外の時間帯は放牧期と同様とした。これら放牧馴致期および舎飼い馴致期においては、飼料は舎飼い期と同様の配合飼料と舎飼い期の半分のオーチャード乾草を給与した。

気象データは、東北農研センター内にある厨川気象観測露所から得た。THIは（Hahn 1999）による以下の式を用いて算出した。

$$THI = (0.81 \times TAVE) + RHUM (TAVE - 14.4) + 46.4$$

TAVE: 日平均気温 (°C)，RHUM: 日平均湿度 (小数点表示)

放牧期と舎飼い期における THI は同じとみなし、放牧期および舎飼い期と

もに上記の THI の値を用いた。

(2) 尿採取

供試牛からのスポット尿は、-6 日目（試験開始直前期）、0、1、2、3、4 日目（放牧馴致期）、7、8、9、14、27 日目（放牧期）、28、29、30、31、32 日目（舎飼い馴致期）、35、36、37、42、55 日目（舎飼い期）に、1 日 1 回、09:00 以降最初の排泄物を採取した。各尿のうち 30ml をフィルターで濾過し不純物を取り除き、分析まで-20℃で保存した。

(3) 分析方法

尿中コルチゾールは、市販の EIA キットを用いて測定した（Oxford Biomedical Research, Inc., Oxford, MI, USA）。尿中コルチゾールは、尿の希釈率を補正するため、尿中のクレアチニン濃度に対する比で表した。クレアチニンは、Jaffe 法により測定した（クレアチニンテスト、和光純薬、大阪、日本）。尿中コルチゾールレベルは、ng/mg クレアチニンを単位とした。

(4) 行動調査

Period3 において、放牧期および舎飼い期における供試牛の伏臥動作と起立動作をビデオカメラに記録した。記録は連続する 2 日間、09:00 から 4.5 時間行った。起立動作および伏臥動作を、Hultgren (2001) の報告に従い、それぞれ 2 つの動作（Stage 1 および Stage 2）に分割し（Table3-1）、それらに要する時間を計測した。

(5) 統計処理

尿中コルチゾールレベルは SAS (Version9.21; SAS Institute, Cary, NC, USA) の MIXED プロシジャを用いて解析した。個体を変量効果、飼育方式、Period およびそれらの交互作用を母数効果として解析し、交互作用が有意な場合においては、Period ごとに飼育方式の効果を Scheffe の多重比較に基づき解析した。次に、THI を 72 以上および 72 未満に分け、THI の水準ごとに、個体

を変量効果，飼育方式を母数効果とし，Scheffe の多重比較による解析を行った。また，飼育方式ごとに，個体を変量効果，THI を母数効果として解析した。行動調査によるデータについては，各飼育方式下の個体ごとの平均値を Wilcoxon の符号化順位検定により解析した。

3.2.3. 結果および考察

各 Period の気象条件を Table3-2 に示した。試験開始直前期，放牧期および舎飼い期における日平均乳量は，それぞれ 25.1 kg/頭，24.6 kg/頭および 21.5 kg/頭であった。

尿中コルチゾールレベルは，尿採取日と Period の交互作用が高度に有意 ($P = 0.0002$) だったため，Period ごとに分けて Fig. 3-6 に示した。Period 3 では，放牧期の方が舎飼い期よりも尿中コルチゾールレベルの平均値は高かった (13.2 ± 0.68 vs. 9.27 ± 0.40 ng/mg クレアチニン, $P < 0.01$)。Period 3 では，放牧期の THI が高く，そのことにより尿中コルチゾールレベルが高まった可能性が考えられた。THI は，暑熱ストレスを表す際に使われる指標であり，THI が 72 を超えると乳量が減少し始めると言われている (Ravagnolo ら 2000)。そこで，本試験においても THI を 72 で分け，Period をすべてまとめて解析した。THI72 以上では，尿中コルチゾールレベルは飼育方式全体に何らかの差が見られたが ($P < 0.05$, Fig. 3-7)，多重比較を用いた解析では飼育方式間に有意差は見られなかった。また，飼育方式ごとに THI の効果を解析した結果，放牧期における尿中コルチゾールレベルは，THI72 以上の方が THI72 未満よりも高かった。これは，THI が高くなるにつれて乳中コルチゾールが上昇したという Zahner ら (2004) の報告と一部一致している。

しかしながら，放牧期を除いては，THI による尿中コルチゾールレベルの差

は見られなかった。暑熱ストレスがコルチゾールレベルに及ぼす影響については、これまでにいくつか報告されている。しかし、慢性的な暑熱ストレスにより、血液中コルチゾール濃度は、上昇した (Elvinger ら 1992; Chaiyabutr ら 2008), 減少した (Adeyemo ら 1981; Correa-Calderon ら 2004), あるいは変化しなかった (Bouraoui ら 2002) とあり、統一した見解は得られていない。本試験においても、放牧や舎飼いといった飼育方式の違いによって、THI がコルチゾールレベルに及ぼす影響に違いが見られ、暑熱によるストレス反応は、そのウシがおかれている飼育方式によって異なる可能性が示唆された。

放牧は、牛舎よりもウシにとって行動の自由度が高くなる点では、アニマルウェルフェアにとって好ましい飼育方式であると一般的に思われている (Hemsworth ら 1995)。3.1.における日本短角種を用いた試験では、放牧よりも舎飼いにおいて一時的な尿中コルチゾールレベルの上昇がみられ、放牧は牛舎よりもストレスの少ない飼育環境であることが生理学的にも示された。しかし、Legrand ら (2009) や Falk ら (2012) は、THI が上昇するにつれて、ホルスタイン種泌乳牛が日中に放牧地で過ごす時間は減少した、と報告している。また、ホルスタイン種は特に暑熱に弱い品種であり (Garcia-Peniche ら 2005), さらに泌乳牛ではルーメン発酵や代謝の過程における熱生産が著しく、暑熱ストレスに冒されやすい (Bernabucci ら 2010)。以上のことから、夏季の放牧は、その時の THI が 72 を超えるような場合は、ホルスタイン種泌乳牛にとっては、舎飼いよりもストレスになり得ると考えられた。

起立動作にかかる時間は、Stage 1, Stage 2 とともに放牧と舎飼いで差はなかった (Table 3-3)。伏臥動作にかかる時間は、Stage 2 では放牧と舎飼いで差はなかったが、Stage 1 に関しては放牧の方が舎飼いよりも短かった。Krohn と Munksgaard (1993) はタイストールとルーズバーンでのウシの伏臥動作を調べ、タイストールでは伏臥動作や、伏臥動作の準備にかかる時間が長かった、

と報告している。Kondoら（2007）もまた、放牧地のウシよりも、つなぎ飼いされたウシの方が、前肢を踏み始めた時間から完全に伏臥するまでの時間が長かったと報告している。これらの結果から、ホルスタイン種泌乳牛においても、行動学的には、3.1.と同様に、放牧地のウシの方が、牛舎でつなぎ飼いされたウシよりもウシ本来の行動様式を示しやすいと考えられた。

3.1.では、放牧から舎飼いへの飼育方式の変化後約1週間、尿中コルチゾールレベルは高値を示したが、その後は変化前のレベルへと回復した。しかし本節では、飼育方式の変化直後である放牧馴致期や舎飼い馴致期において尿中コルチゾールレベルの上昇は見られなかった。本節では、乳生産を行っているホルスタイン種のコンディションを考慮し、飼育方式の切り替えを急激に行わず、徐々に慣れさせる「馴致」を行った。どのような方法であれ、馴致には、日増体量の低下改善や、呼吸器病、消化器病の発症抑制などの効果があると言われており（仮屋 2005）、この「馴致」によってストレスが緩和された可能性もある。また、本節の試験のPeriod 3では、3週間の放牧期において尿中コルチゾールレベルは高値を維持し、コルチゾール分泌の反応は持続的であった。これは、飼育方式だけではなく、暑熱の影響も受けたためかもしれない。本試験では、舎飼いといっても、1日のうち数時間はパドックに放たれる、半屋外飼育であった。そのため、放牧飼育との明確な違いは、生草摂取、十数時間のつなぎ飼育、が主なものであり、これらが、飼育方式の違いによる尿中コルチゾールレベルの差に影響しているのかもしれない。

以上のことからまとめると、ホルスタイン種泌乳牛においては、3.1.のような舎飼いでの尿中コルチゾールの上昇は見られず、むしろ、THIが72を超えると、放牧飼育下においてのみ尿中コルチゾールレベルの上昇が見られた。ホルスタイン種泌乳牛にとって夏季の放牧は、舎飼いと比較し行動の自由度は大きく、アニマルウェルフェアの5つの自由のうち、「通常行動への自由」は満

たされているが、コルチゾールの上昇を伴う生理的なストレスとなり、「不快からの自由」は保証されないことが示唆された。3.1.とあわせると、ホルスタイン種と日本短角種では、放牧や舎飼いといった飼育方式や暑熱に対する生理反応に品種間差が存在すると考えられた。

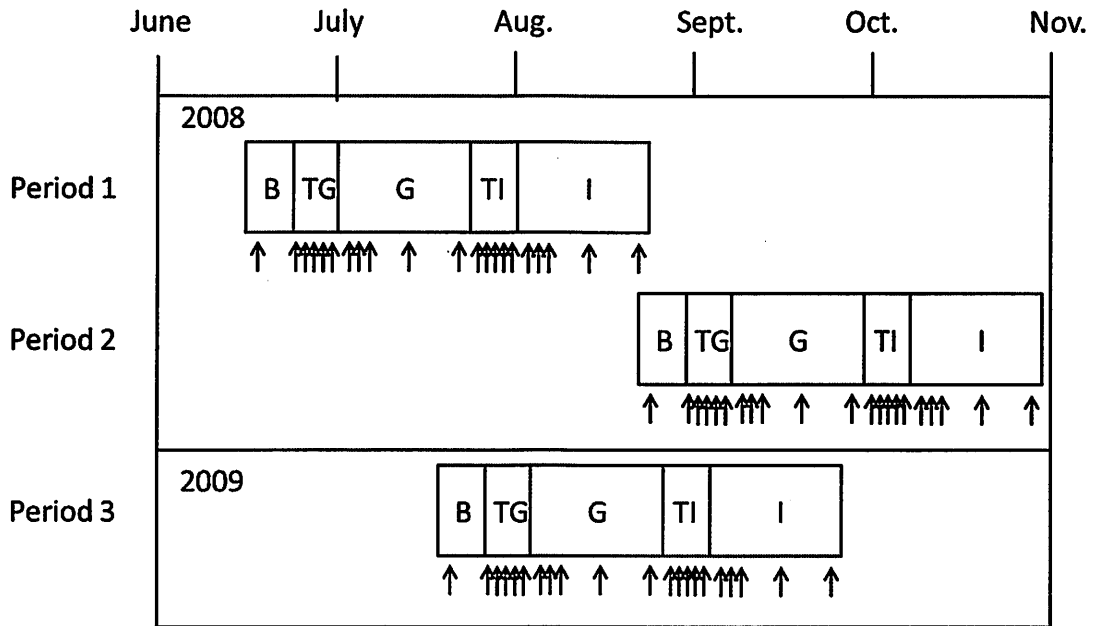


Fig. 3-4 Schematic representation of the experiment design. B = before the experiment; TG = transition phase to adapt to grazing; G = grazing; TI = transition phase to adapt to indoors; I = indoors. Arrows indicate urinary sampling.

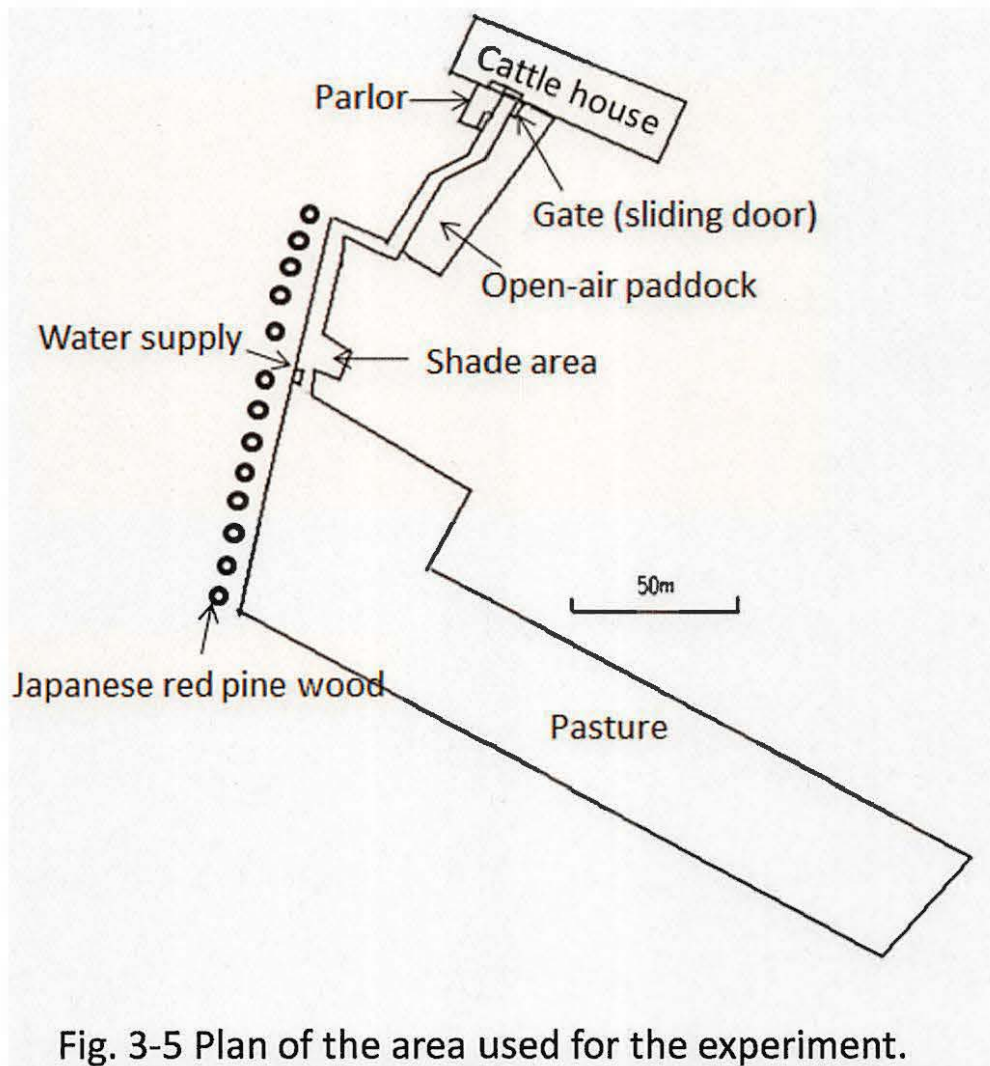


Fig. 3-5 Plan of the area used for the experiment.

Table 3-1 Definition of recorded behavioral events.

Event	Deficition
Rising	
Start of rising stage 1	Chest lifted from the floor, using carpal joint
Start of rising stage 2	Hind part lifted and hind legs stretched
End of rising stage 2	Both front feet placed on the floor
Lying down	
Start of lying down stage 1	Start of pending head movement
Start of lying down stage 2	First carpal joint touches the floor
End of lying down stage 2	Chest rests on the floor

Table 3-2 Summary of ambient temperatures and Temperature-Humidity Index (THI) values per period during the study†.

Period	Temperature (°C)		Temperature-Humidity Index	
	Mean	Range	Mean	Range
1	21.4	7.3-33.0	68.9	57.9-76.6
	(22.2)	(13.8-31.5)	(70.4)	(61.7-74.5)
2	17.1	2.6-30.4	62.4	50.1-75.5
	(18.0)	(17.3-28.9)	(63.8)	(50.6-70.2)
3	20.9	8.0-31.3	57.2	57.2-76.4
	(23.2)	(16.2-31.3)	(72.5)	(68.5-76.4)

†Data in the grazing phase are in parentheses.

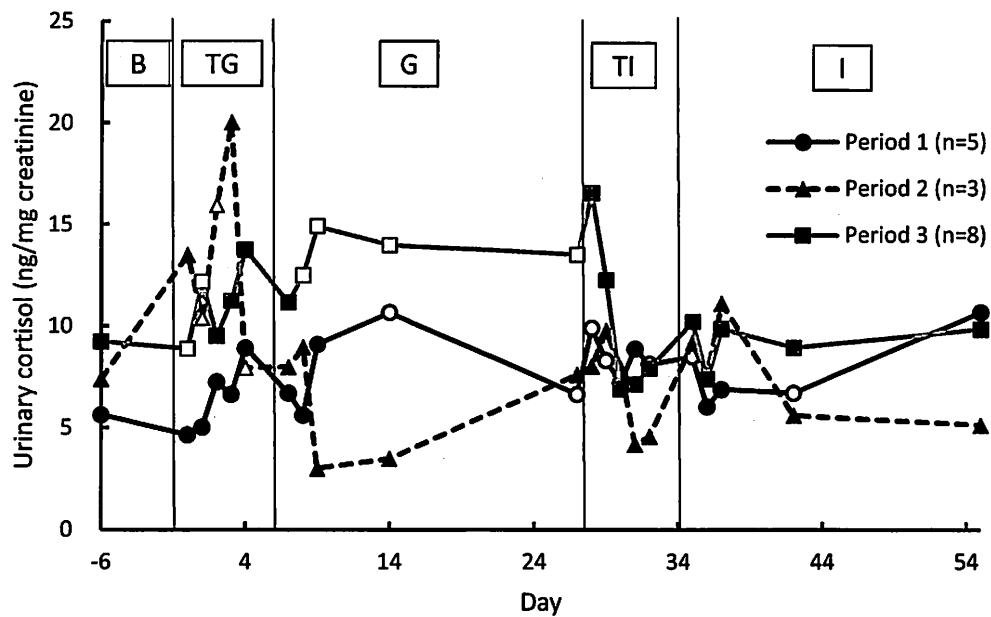


Fig. 3-6 Urinary cortisol levels of cows under THI levels above 72 (open circles, triangles or squares) and below 72 (closed circles, triangles or squares) for Periods 1, 2, and 3. B = before the experiment; TG = transition phase to adapt to grazing; G = grazing; TI = transition phase to adapt to indoors; I = indoors.

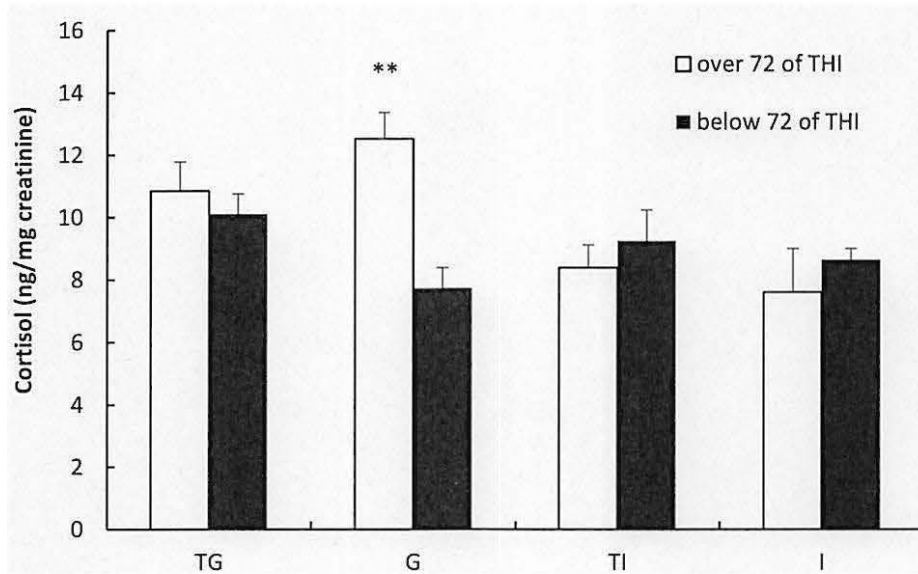


Fig. 3-7 Urinary cortisol levels of cows for THI levels above and below 72. TG = transition phase to adapt to grazing; G = grazing; TI = transition phase to adapt to indoors; I = indoors. Values are means \pm standard errors. ** indicates significant differences between high and low THI groups ($P < 0.01$).

Table 3-3 Duration of lying down and rising of cows in the Grazing and Indoors phases during Period 3 (median).

	Grazing		Indoor		<i>P</i>
	Median	n	Median	n	
Rising					
Stage 1 (s)	1.69	6	3.86	6	0.173
Stage 2 (s)	2.90	6	2.73	6	0.753
Lying down					
Stage 1 (s)	3.80	7	11.6	7	0.018
Stage 2 (s)	5.18	7	5.15	7	0.398

3.3. 飼育方式によって変化する尿中コルチゾールレベルの日本短角種およびホルスタイン種における品種間比較

3.3.1. 緒言

3.1.では、日本短角種において、飼育方式を放牧から舎飼いに变化させると、尿中コルチゾールレベルの上昇が見られることを明らかにした。一方 3.2.では、ホルスタイン種において、THIが高いときは舎飼いよりもむしろ放牧で、尿中コルチゾールレベルが高まることを明らかにした。これらのことから、ホルスタイン種と日本短角種では、放牧や舎飼いといった飼育方式に対する生理反応に品種間差が存在する可能性が示唆された。また、ホルスタイン種では、尿中コルチゾールレベルは暑熱によって変化するが、その反応は飼育方式によって異なることも明らかとなった。

日本短角種における暑熱の影響については、これまでに、松川と今村(1976)による、黒毛和種は日本短角種よりも耐暑性がある、という報告のみで詳しくは調べられておらず、暑熱に対する生理反応については不明な点が多い。他の品種を用いた暑熱に対する品種間差については、これまでも多く報告されており、例えば、ジャージー種やブラウンスイス種は、ホルスタイン種と比較し暑熱に対する抵抗性があると言われている(Garcia-Penicheら 2005)。また、暑熱に対する感受性はウシの用途にも依存する、すなわち、乳用牛は乳生産による熱生産があるため、肉用牛よりも暑熱に対する感受性は高いという報告もある(Bernabucciら 2010)。加えて、ストレスに対する内分泌や代謝反応は、遺伝的要因がきわめて重要な役割を果たすといわれており(Garcia-Belenguerら 1996)、ストレス反応においても、品種間で異なる可能性は十分に考えられる。

そこで、放牧や舎飼いといった飼育方式が尿中コルチゾールレベルに及ぼす影響について、ホルスタイン種と日本短角種間で比較検討し、THIの影響についてもあわせて検討した。本試験では、別の目的のために2006年から2011年の間に行われた7つの試験から試料を得た。ただし、暑熱時のデータが少なかつたため、ホルスタイン種のデータの一部については、3.2.で用いたデータを使用した。

3.3.2. 材料および方法

(1) 供試動物および試験方法

試験は東北農業研究センター内（岩手県盛岡市）と北海道農業研究センター内（北海道札幌市）の2箇所で行った。ホルスタイン種50頭（平均体重 598 ± 9.8 kg, 平均年齢 3.80 ± 0.26 才）と日本短角種17頭（平均体重 553 ± 34 kg, 平均年齢 3.9 ± 0.6 才）を供試した。THIが高い時のデータが限られていたため、ホルスタイン種50頭のうち16頭については、3.2.で供試したウシのデータの一部を使用した。ただし、放牧馴致期および舎飼い馴致期のデータについては、放牧、舎飼いの仕分けが不明瞭なため除外した。ホルスタイン種50頭中6頭については、Asakumaら（2010）の報告に詳細が述べられている。5頭については、Uedaら（2011）の報告に詳細が述べられているが、その中の24時間放牧していた試験牛のみを本試験では使用した。

すべてのウシは放牧（ホルスタイン種44頭、日本短角種17頭）あるいは舎飼い（ホルスタイン種42頭、日本短角種17頭）下で飼育されていた。放牧におけるホルスタイン種14頭および舎飼いにおけるホルスタイン種6頭は北海道農業研究センターで飼育され、その他はすべて東北農業研究センターで飼育されていた（Table 3-4）。ホルスタイン種はすべて泌乳牛で1日2回搾乳であ

った。

放牧では、日本短角種は昼夜放牧であり、ホルスタイン種は搾乳時間以外昼夜放牧であった。放牧地は 0.5-4 ha で、第一優占草種はオーチャードグラス (*Dactylis glomerata* L.) , ペレニアルライグラス (*Lolium perenne* L.) , メドウフェスク (*Festuca pratensis* Huds.) またはケンタッキーブルーグラス (*Poa pratensis* L.) であり、数区画に分け 1-3 日ごとに転牧した。搾乳に要する養分摂取が必要なため、ホルスタイン種においてのみ搾乳時に配合飼料を給与した。

舎飼いでは、ホルスタイン種 6 頭と日本短角種 5 頭については、約 1 m の鎖またはロープでつながれ、ホルスタイン種においては搾乳時間を除くが、24 時間のつなぎ飼いとした。つなぎ飼いのホルスタイン種 6 頭においては別の舎飼い飼育も行われた。すなわち、この 6 頭と他のホルスタイン種 30 頭は、前述のようにつなぎ飼いされたが、1 日に約 5.5 時間、牛舎に隣接する外のパドックに放たれた。日本短角種 7 頭については、牛舎でスタンションにて繋留されたが、1 日に約 6 時間牛舎に隣接する外のパドックに放たれた。残りのホルスタイン種 6 頭と日本短角種 5 頭は、それぞれフリーストールまたはルーズバーンで飼育された。舎飼い時には、乾草または牧草サイレージと配合飼料を給与した。すべてのウシにおいて水と鉱塩は自由摂取とした。

気象データは、東北農業研究センター内にある厨川気象観測露所および北海道農業研究センター内にある羊ヶ丘気象観測露所から得た。THI は (Hahn 1999) による以下の式を用いてそれぞれ算出した。

$$\text{THI} = (0.81 \times \text{TAVE}) + \text{RHUM} (\text{TAVE} - 14.4) + 46.4$$

THI: 温湿度指数, TAVE: 日平均気温 (°C) , RHUM: 日平均湿度 (小数点表示)

放牧および舎飼いにおける THI は同じとみなし、放牧および舎飼いともに

上記の THI を用いた。

(2) 尿採取

供試牛からのスポット尿は、放牧においては 1 頭あたり 1-8 回、舎飼いでは 2-9 回採取した。尿採取は 07:30 から 13:00 の間に 1 日につき 1 回行った。各尿のうち 30ml をフィルターで濾過し不純物を取り除き、分析まで -20℃ で保存した。

(3) 分析方法

尿中コルチゾールは、市販の EIA キットを用いて測定した (Oxford Biomedical Research, Inc., Oxford, MI, USA)。尿中コルチゾールは、尿の希釈率を補正するため、尿中のクレアチニン濃度に対する比で表した。クレアチニンは、Jaffe 法により測定した (クレアチニンテスト, 和光純薬, 大阪, 日本)。尿中コルチゾールレベルは、ng/mg クレアチニンを単位とした。

(4) 統計処理

尿中コルチゾールレベルは SAS (Version 9.21; SAS Institute, Cary, NC, USA) の MIXED プロシジャを用いて解析した。THI は、72 を超えると乳牛において乳量が減少すると言われていることから (Ravagnolo ら 2000), 72 以上および 72 未満で分けた。個体を変量効果, 飼育方式 (放牧および舎飼い), 品種 (ホルスタイン種および日本短角種), THI (THI72 以上および 72 未満), およびそれらの交互作用を母数効果として解析した。交互作用が有意な場合においては, 飼育方式, 品種, または THI 内において単純主効果の検定を行った。さらに, 飼育方式×品種, 品種×THI, または飼育方式×THI 内において, 個体を変量効果とし, THI, 飼育環境, または品種をそれぞれ母数効果として解析した。

3.3.3. 結果および考察

Table3-5 には、東北農業研究センターおよび北海道農業研究センターにおける、本試験で行った尿採取期間中の気象状況を示した。

尿中コルチゾールレベルについては、飼育方式、品種、THIの3つの因子間の交互作用は有意ではなかった ($P=0.69$, Table 3-6) が、飼育方式と品種との間の交互作用は有意であった ($P<0.01$)。そこで、飼育方式ごとに品種の、または、品種ごとに飼育方式の影響を調べた。その結果、放牧において、尿中コルチゾールレベルはホルスタイン種の方が日本短角種よりも高かった ($P<0.01$) が、舎飼いにおいては、2つの品種間で差はなかった (Fig. 3-8)。日本短角種は、伝統的に夏山冬里方式で飼育されており (高安 1983)、また、3.1.において放牧開始直後から体重の増加がみられたように、放牧に対する適応能力が高い品種であると考えられる。ホルスタイン種は、放牧飼育下において、ジャージー種と比較し、ボディコンディションスコアが低く、乳房炎の発症率が高く、さらに繁殖率も低いと言われている (Washburn ら 2002)。また、Prendiville ら (2010) は、バイト速度や食草時間といった、放牧に関連する能力には明確な品種間差があると報告している。これらのことから、放牧飼育に対するストレスは、日本短角種の方がホルスタイン種よりも少なく、日本短角種の優れた放牧適性を反映していると考えられた。

また、サシバエやアブのような刺咬性昆虫は、放牧牛に対し負の影響を及ぼすことがわかっている。例えば、それらはウシに頭振り、脚上げ、尻尾振りなどの行動を誘発し、一連の食草行動を阻害し、牧草摂取量を減少させると言われている (Dougherty ら 1993)。Steelman ら (1991) は、ウシの品種間で、ノサシバエの個体群密度に違いがあるということを報告しており、本試験では刺咬性昆虫の調査は行っていないが、このような違いが、品種間で尿中コルチ

ゾールレベルに違いをもたらした可能性も考えられた。

また、ホルスタイン種では、尿中コルチゾールレベルは放牧において舎飼いよりも高かった ($P < 0.01$, Fig. 3-8)。一般的に、放牧は舎飼いよりもウェルフェアレベルが高いと考えられているが、ホルスタイン種に放牧地と牛舎を自由に出入りさせると、常に放牧地にとどまるというわけではない。むしろ、日中の THI が高い時や、夜間の降雨時では、放牧地よりも牛舎で過ごす時間が長い (Legrand ら 2009; Falk ら 2012)。また、そのような飼育方式の選択に、乳量、BCS やこれまでの経験 (Charlton ら 2011b)、さらに放牧地と牛舎間の距離 (Charlton ら 2011a) が影響を及ぼすという報告もある。本試験の結果から、ホルスタイン種にとって、放牧は舎飼いよりもストレスレベルの高い飼育方式であることが示唆された。しかし、本試験は、別の目的で行われた 7 つの試験で供試されたウシの試料を用いて解析したものであり、乳量や BCS 等については考慮しておらず、今後のさらなる研究が必要である。また、3.2. では、THI72 以上においてのみ、飼育方式による尿中コルチゾールレベルの違いが認められたが、本試験では、標本数が増えたために、THI に関係なく差が検出されたと考えられた。

一方、日本短角種では、尿中コルチゾールレベルは舎飼いにおいて放牧よりも高かった ($P < 0.01$, Fig. 3-8)。3.1. では、放牧地から牛舎でのつなぎ飼いへと飼育方式を変えると、尿中コルチゾールレベルは上昇したが、その上昇は約 1 週間持続したのみで、それ以降は元のレベルに回復した。このことは、コルチゾール分泌のフィードバック機能や、新規環境に対する適応の存在によるものと考えられる。しかし、慢性的なストレスによってコルチゾールレベルの基礎値はわずかながら上昇すると言われており (Mormede ら 2007)、本試験では標本数が増えたためにそれを検出できたと考えられた。

飼育方式と THI との間には有意な交互作用が認められたが ($P < 0.05$, Table

3-6) , THI72 以上および 72 未満において、飼育方式の単純主効果は認められなかった (THI72 以上, 放牧 8.83 ± 0.64 vs. 舎飼い 6.65 ± 0.63 ng/mg クレアチニン, $P = 0.51$; THI72 未満, 放牧 8.99 ± 0.43 vs. 舎飼い 9.02 ± 2.82 ng/mg クレアチニン $P = 0.76$) . また, 放牧および舎飼いにおいて, THI の単純主効果は認められなかった (放牧, $P = 0.24$; 舎飼い, $P = 0.87$) .

品種と THI の間の交互作用は、完全には否定できなかった ($P = 0.13$, Table 3-6) . そこで, 品種ごとに THI の, または THI ごとに品種の影響を調べた. その結果, ホルスタイン種では, 尿中コルチゾールレベルは, THI72 以上において THI72 未満よりも高かった ($P < 0.01$, Fig. 3-9) . しかし, 放牧では THI72 以上 12.1 ± 0.79 , THI72 未満 9.99 ± 0.55 ng/mg クレアチニンであったが, 舎飼いでは, THI72 以上 8.48 ± 1.23 , THI72 未満 8.80 ± 0.24 ng/mg クレアチニンであり (Table 3-6), 放牧においてのみ暑熱による尿中コルチゾールレベルの上昇が見られた. 一方, 日本短角種では, THI による尿中コルチゾールレベルの差は見られなかった. また, THI72 以上では, 尿中コルチゾールレベルは, ホルスタイン種において日本短角種よりも高かった ($P < 0.01$) . THI72 未満においても, 尿中コルチゾールレベルは, ホルスタイン種において日本短角種よりも高い傾向にあった ($P < 0.06$) . しかし, 放牧ではホルスタイン種 9.99 ± 0.55 , 日本短角種 6.79 ± 0.56 ng/mg クレアチニンであったが, 舎飼いでは, ホルスタイン種 8.80 ± 0.24 , 日本短角種 9.94 ± 1.07 ng/mg クレアチニンで (Table 3-6), その傾向は放牧においてのみ見られた.

THI は, 暑熱ストレスを表す際によく使われる指標であるが, 3.2.でも述べたように, 慢性的な暑熱ストレスとコルチゾールレベルの関係については, これまでに統一した見解はない. しかし, 慢性的な暑熱ストレスによるコルチゾールレベルの減少は暑熱ストレスに対する適応を, 逆に, 暑熱ストレスによるコルチゾールレベルの増加はストレスに対する負荷を示唆すると言われている

(Silanikove 2000) . 本試験における結果から、ホルスタイン種では、特に放牧時において、THI72 以上という暑熱に対し生理反応の影響を受けやすいことが明らかとなった。また、日本短角種では THI72 程度の暑熱では尿中コルチゾールレベルは変化せず、ホルスタイン種と日本短角種間には暑熱に対する感受性に差があることが示された。乳生産はそれによる代謝熱発生のため暑熱ストレスが増長すると言われているが (Bernabucci ら 2010) , 本試験では乳量を調査していない。また、黒毛のウシは、明るい毛のウシよりも暑熱に敏感だという報告もあり (Brown-Brandl ら 2006) , 乳量や毛色等、今後、検討していかなければならない。

以上のことからまとめると、舎飼いでは、ホルスタイン種と日本短角種との間で尿中コルチゾールレベルに差はなかったが、放牧ではホルスタイン種の方が日本短角種よりも尿中コルチゾールレベルは高かった。また、3.1.や 3.2.と同様に、ホルスタイン種では、放牧よりも舎飼いで尿中コルチゾールレベルは高く、日本短角種では放牧よりも舎飼いで尿中コルチゾールレベルは高かった。さらに、ホルスタイン種では、日本短角種よりも特に放牧において暑熱の影響を受けやすいことも明らかとなった。これらのことから、飼育方式および (または) 暑熱に対するストレス反応は、ウシの品種間で差があることが示唆された。しかし、本試験では、乳量や BCS、試験開始前までの飼育方式をはじめ、放牧条件や牛舎施設は考慮していない。また、日本短角種とホルスタイン種を比較したが、両品種を同時に同一環境で試験しておらず、今後、各種条件をそろえ、詳細に検討する必要がある。

Table 3-4 Summary of the experimental animals used in this study†

	NARO/TARC				NARO/HARC			
	Pasture		Indoors		Pasture		Indoors	
	H	JS	H	JS	H	JS	H	JS
Number of animals	30 [‡]	17 [§]	36 [‡]	17 [§]	14 [¶]	0	6 [¶]	0

† NARO/TARC = NARO Agricultural Research Center for Tohoku Region, NARO/HARC = NARO Agricultural Research Center for Hokkaido Region, H = Holstein, JS = Japanese Shorthorn.

[‡]The same 30 H cows were used in the Pasture and the Indoors at the NARO/TARC.

[§]The same 17 JS cows were used in the Pasture and the Indoors at the NARO/TARC.

[¶]The same 6 H cows were used in the Pasture and the Indoors at the NARO/HARC.

Table 3-5 Summary of the weather data during the urinary sampling of cows in this study[†]

Weather variable	NARO/TARC		NARO/HARC	
	Mean	Range	Mean	Range
Air temperature (°C)	17.9	-1.9-34.1	19	9.8-28.7
THI [§]	63.6	39.9-79.0	65.4	59.3-71.8
Relative humidity (%)	76.5	42.0-97.0	79.3	61.7-90.5
Solar radiation (W/m ²)	160	13.3-330	219	53.9-352
Wind speed (m/s)	2.33	n/a-15.1	3.05	n/a-9.2

[†]NARO/TARC = NARO Agricultural Research Center for Tohoku Region, NARO/HARC = NARO Agricultural Research Center for Hokkaido Region, H = Holstein, JS = Japanese Shorthorn.

[§]THI = Temperature Humidity Index.

n/a = Not available.

Table 3-6 Urinary cortisol levels of Holstein and Japanese Shorthorn cows reared under grazing and indoor housing conditions and at high (≥ 72) and low (< 72) THI levels.

Item	Holstein				Japanese Shorthorn				P value [‡]						
	Grazing		Indoor housing		Grazing		Indoor housing		B	S	T	B × S	S × T	B × T	B × S × T
	High	Low	High	Low	High	Low	High	Low							
Animal	13	44	11	42	7	17	7	17							
Cortisol [§]	12.1	9.99	8.48	8.80	4.90	6.79	5.61	9.94	<0.01	0.77	0.68	<0.01	0.04	0.13	0.69
SEM [¶]	0.79	0.55	1.23	0.24	0.52	0.56	0.62	1.07							

[‡]B = main effect of breed; S = main effect of breeding system; T = main effect of THI; B × S = interaction of breed and breeding system; S × T = interaction of breeding system and THI; B × T = interaction of breed and THI; B × S × T = interaction of breed, breeding system, and THI.

[§]Cortisol concentration is shown as ng/mg creatinine.

[¶]SEM = standard error of the mean.

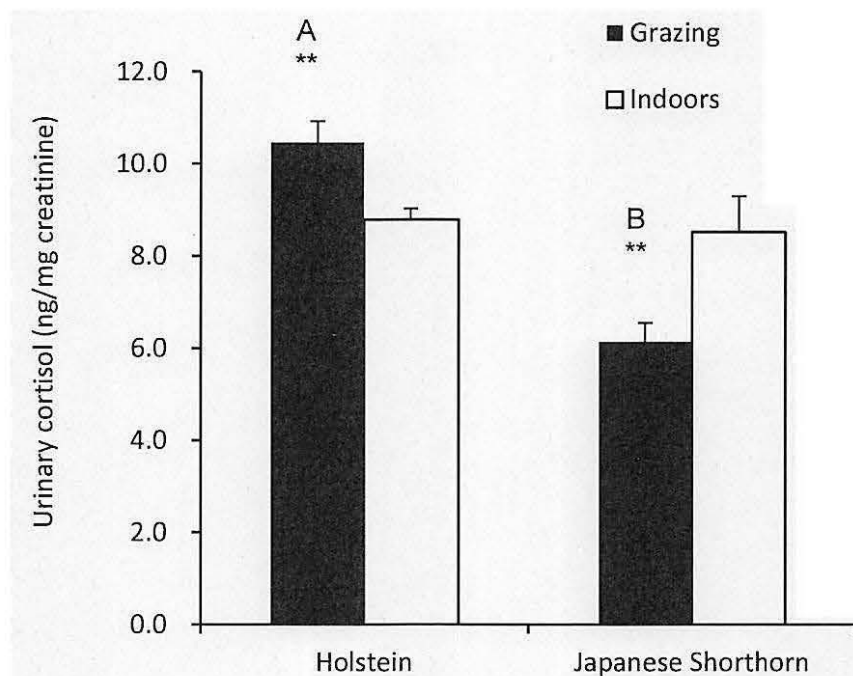


Fig. 3-8 Urinary cortisol levels of Holstein and Japanese Shorthorn cows reared under grazing and indoor housing conditions. Values are means \pm standard errors. ** indicates significant differences between grazing and indoor housing conditions within the same breed ($P < 0.01$). Different letters indicate significant differences between Holstein and Japanese Shorthorn cows within the same breeding system ($P < 0.01$).

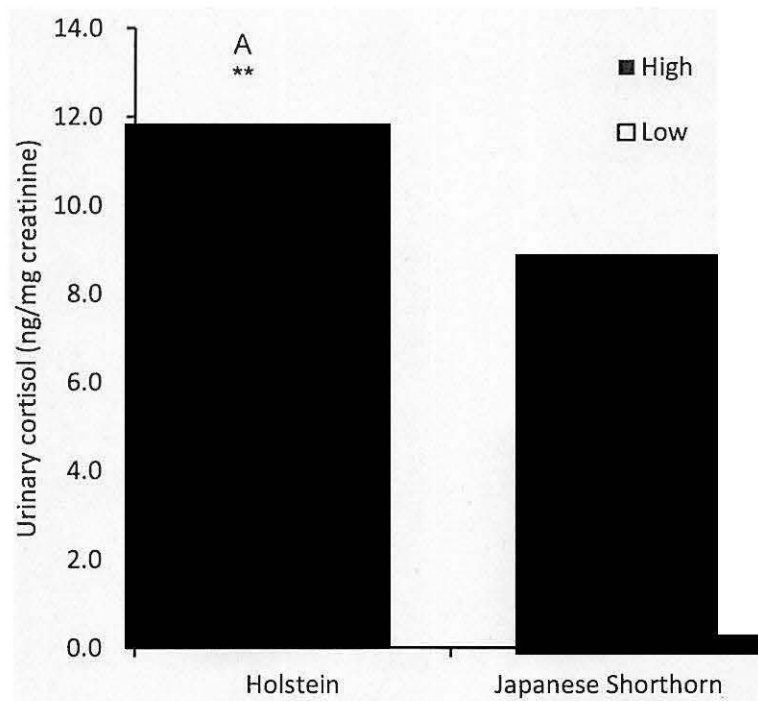


Fig. 3-9 Urinary cortisol levels of Holstein and Japanese Shorthorn cows at high (≥ 72) and low (< 72) THI levels. Values are means \pm standard errors. ** indicates significant differences between THI ≥ 72 and THI < 72 within the same breed ($P < 0.01$). Different letters indicate significant differences between Holstein and Japanese Shorthorn cows within the same THI group ($P < 0.01$).

3.4. 小括

本章では、前章でストレス指標としての有効性が示された尿中コルチゾールレベルを用いて、日本短角種およびホルスタイン種を対象に、放牧および舎飼い飼育下におけるストレスレベルを調べた。その結果、日本短角種では、一時的な反応の場合もあるが、舎飼い飼育下の方が放牧飼育下よりも尿中コルチゾールレベルは高かった。一方、ホルスタイン種では、放牧飼育下の方が舎飼い飼育下よりも尿中コルチゾールレベルは高かった。これらのことから、日本短角種では、放牧よりも舎飼いの方がストレスレベルの高い飼育方式であり、逆にホルスタイン種では、舎飼いよりも放牧の方がストレスレベルの高い飼育方式であることが示唆された。さらに、ホルスタイン種では、暑熱ストレスが加わると、尿中コルチゾールレベルは放牧時において上昇したが、舎飼い時にその変化は見られなかった。一方、日本短角種では、暑熱ストレスが加わっても尿中コルチゾールレベルに変化は見られなかった。ホルスタイン種は暑熱に弱い品種とされている (Sharma ら 1983) が、特に放牧環境において暑熱ストレスの影響を受けやすいことも明らかとなった。日本短角種における暑熱感受性についてはこれまで明らかにされてこなかったが、本試験から、THI が 72 程度の暑熱暴露ではストレス反応は影響を受けないことが明らかとなった。

以上のことから、同じウシでも、品種によって、放牧や舎飼いといった飼育方式や暑熱に対するストレスレベルは異なることが示された。暑熱ストレスに対する反応が品種で異なることはこれまでに報告されているが (Garcia-Peniche ら 2005) 、本試験から、その反応には飼育方式が影響を及ぼすことが示された。よって、ウシの暑熱ストレスを検討する際には、品種に加え、その飼育方式についても考慮する必要性が示唆された。これらのことは、尿中コルチゾールレベルをストレス指標とした場合の結論であるが、行動学的

指標では、日本短角種、ホルスタイン種ともに、放牧の方が舎飼いよりも行動の自由度は高い飼育方式であることが示された。ストレス状態を正確に解釈するためには、行動学的指標と生理学指標を総合して判断する必要があると言われており (Terlouw ら 2009) , さらにより多くの指標を取り入れ、ストレス反応を理解していくことが望まれる。

第4章 総合考察

本研究では、ウシにおいて尿中コルチゾールレベルがストレス指標となりうるかについて検討し、さらにそれを用いて、放牧牛のストレス評価を行った。本章では、第2章および第3章で明らかになった結果をまとめるとともに、今後の研究の方向性について考察した。

4.1. ストレス指標としての尿中コルチゾールレベルについて

第2章において、ウシを用いて、尿中クレアチニンに対する尿中コルチゾールの比である尿中コルチゾールレベルが、血液中コルチゾール濃度に代わるストレス指標になるのかについて検討した。ウシの静脈中に ACTH を投与し、血液中コルチゾール濃度を人為的に変化させると、尿中コルチゾールレベルもそれと同様の変化を示した。また、ウシに、精神的ストレッサーまたは身体的ストレッサーを負荷すると、尿中コルチゾールレベルの上昇が確認できた。これらのことから、尿中コルチゾールレベルは、血液中コルチゾールに代わるストレス指標として有効であると考えられた。これらのことは、急性ストレスに対する反応であるが、慢性ストレスについては、血液中コルチゾール濃度を指標として利用するのは難しいとされてきた。なぜなら、血液中に分泌されたコルチゾールは、コルチゾール分泌を促進する働きがある ACTH, CRH 分泌を抑制し、ACTH は ACTH 分泌を促進する働きがある CRH 分泌を抑制する、というように、生体の HPA 軸には恒常性を保つようフィードバック機能が存在するからである。そこで、単純なコルチゾール濃度ではなく、ACTH に対するコルチゾール分泌の反応性から慢性ストレスを評価すべきだという意見もある。しかし、雄牛への4週間のつなぎ飼いは、ACTH に対するコルチゾール分泌を低

下させたという報告 (Ladewig と Smidt 1989) がある一方、乳牛への 3 週間の横臥制限あるいは社会的隔離は ACTH に対するコルチゾール分泌の低下を認めないという報告 (Munksgaard と Simonsen 1996) があるなど、慢性ストレスと ACTH 刺激に対するコルチゾール分泌反応との関係に統一した見解は得られていない。一方、慢性ストレスによって血漿中コルチゾール濃度はわずかながら上昇するともいわれており (Mormede ら 2007; Trevisi と Bertoni 2009)、ウェルフェアの状態が悪いとランクづけられた農場において、良いとランクづけられた農場と比較し、血漿中コルチゾール濃度の基礎値は高かったと報告されている (Trevisi ら 2005)。尿は、不純物が少ないことに加え、非拘束でかつ牛体に接触することなく採取でき、血液と異なり採取自体がストレスになる危険性は非常に少ない。加えて、尿は数時間蓄積された後排泄されるため、コルチゾール分泌の日内変動を緩衝できる試料だと思われる。従って、尿中コルチゾールレベルは、血液中コルチゾール濃度よりも、慢性ストレスを検出しやすい指標の 1 つではないかと考えられる。また、本研究で用いた尿は、全量ではなくスポット尿を用いたため、採取が簡易という利点があり、実際の現場でも応用でき、この指標を用いて飼育環境を改善できれば生産性の向上につながる。実際、狭小の耕作放棄地への黒毛和種の少頭数放牧は、一般的な大面積放牧地の多頭数放牧よりも、入牧直後において尿中コルチゾールレベルが高まること (出口ら 2007; 出口と東山 2008) や、北東北の酪農現場において、暑熱期は平温期よりも尿中コルチゾールレベルが高まること (深澤ら 2013) が報告され、現場での尿中コルチゾールレベルのストレス指標としての利用が試みられている。また、尿中クレアチニンに対する比で表した尿中カテコールアミンレベルについても検討したところ、そのうち尿中アドレナリンレベルについては、ストレス刺激に対して尿中コルチゾールレベルとほぼ同様の変化を示した。しかし、分析の煩雑性等からコルチゾールの方が利用しやすく、

尿中コルチゾールレベルは、ウシにおけるストレス指標として非常に有効であると考えられた。

4.2. 放牧牛のストレス評価と課題について

第3章において、前述の尿中コルチゾールレベルをストレス指標として、放牧牛のストレスを評価した。その結果、日本短角種とホルスタイン種ではストレス反応が異なった。すなわち、日本短角種では、放牧よりも舎飼いで尿中コルチゾールレベルは高かった。一方、ホルスタイン種では、舎飼いよりも放牧で尿中コルチゾールレベルは高かった。特に、夏季の放牧時において顕著であった。本研究での暑熱試験は、寒冷地である盛岡で実施したものであり、本研究の暑熱環境は暑熱ストレスとは言えないレベルかもしれない。しかし、この程度でも尿中コルチゾールレベルに変化が見られたことから、夏季にホルスタイン種を放牧する場合は、快適な庇陰場所の設置や、夜間放牧に限定するなど、十分に対策を講じる必要があると考えられた。

これまでの放牧牛のストレス評価に関する研究は、行動学的指標を用いたものが多かった。それらの報告では、放牧下のウシの方が舎飼い下のウシよりも休息時間が長く(O'connellら 1989)、常同行動の発現頻度が低い(Redbo 1990)など、放牧は舎飼いよりもストレスが少ない飼育方式であると考察している。実際、ドイツ・オーストリア圏のアニマルウェルフェア評価法であるANIでは、放牧すること自体が重要視され、放牧するだけで高評価になる。また、EUでは、放牧可能な季節にはつなぎ飼いを禁止している国もある(瀬尾 2010)。本研究においても、行動学的指標からは、日本短角種、ホルスタイン種ともに、舎飼いよりも放牧の方が行動の自由度は高い、という結果であった。しかし、ストレス状態を正確に解釈するには、行動学的指標と生理学的指標を組み合わせ

せて総合的に評価する必要があるといわれている (Terlouw ら 2009) . 生理学的指標として尿中コルチゾールレベルを用いると、日本短角種では行動学的指標と同様、放牧はストレスの少ない飼育方式であると言えたが、ホルスタイン種では逆に放牧はストレスになるという結果であった。このように、生理学的指標を取り入れると、すべてのウシにとって、放牧は常にストレスが少ない飼育方式であるとは言えないことが明らかとなった。従って、飼育方式のウェルフェアを論じるとき、放牧は無条件でウェルフェアレベルが高い飼育方式である、と判断するのは危険であり、品種の特性や特徴を考慮する必要があると考えられた。

家畜とは、野生動物を捕獲し飼いならし、人間が都合のよいように作り変えた動物であり、当然、その表現型は野生のものとは異なってくる (本江 2009) . 特にホルスタイン種は、乳用牛群検定牛に限ると、305 日間乳量は 2012 年には全国平均で 9,286 kg となり、1975 年の乳量から 3,460 kg も増加した (家畜改良事業団 2012) ように、飛躍的に改良が進められてきた品種である。このように高度にヒトの手が加えられてきたことが、舎飼いよりも放牧環境で尿中コルチゾールレベルが高くなった理由の一つとして考えられる。一方、日本短角種は、北東北を中心に飼育されてきた品種であり、5-10 月の間は奥山地帯にある放牧地で放牧され、秋が深まると農家に戻り冬の間は農家の牛舎で過ごす、といった夏山冬里方式で伝統的に飼われてきた (川手 2008) . 北東北の厳しい気象条件、草地条件に慣らされてきた関係で、劣悪な飼料の利用性にすぐれ、さらに、まき牛による受胎率も 90%以上という特徴がある (高安 1983) . このような飼育事情が放牧適正へとつながり、舎飼いよりも放牧で尿中コルチゾールレベルが低かったことと関係があるのかもしれない。

放牧は、ウシにとってストレスが少なく快適な飼育方式である、という主観的、経験的知識に対し、科学的手法により客観的に評価し、我が国の放牧普及

に貢献する，というのが本研究の目的であった．それに対し，放牧がウシにとって常にストレスの少ない飼育方式であるとは言えない，というのが本研究結果であり，わが国の放牧普及には直接結びつかないかもしれない．しかし，本研究で得られたそれぞれの品種の特徴を理解することで，ストレスの少ない飼育管理が可能となり，生産性の向上につながると考えられる．

4.3. 今後のストレス研究の展開と方向性

本研究では，「放牧」「舎飼い」とひとまとめにしたが，その環境は千差万別であり，放牧や舎飼いにおけるどの要因が鍵となるのかなどについても検討していかなければならない．また，試験牛の乳量やBCS，過去の飼育方式などには考慮しておらず，今後，これらをそろえて試験を行い，詳細に検討していく必要がある．

また，本研究では，ストレスといった「不快」という負の視点から，飼育方式を評価したが，「快適」という正の視点からの評価も重要である．しかしながら，「快適」指標に関する研究は少なく，「快適」性を数値化するのは難しいとされている．ところが近年，ヒトの分野で，心拍変動の周波数解析により得られる成分が，副交感神経系の活動を単独で反映するパラメーターであるということが明らかとなった（早野 2009；川村 2010）．副交感神経系はリラックス時に活性化することから，これを快適性指標として利用した研究が報告されている（伊藤ら 2009；小倉 2012）．ウシにおいてもいくつか報告はあるが（von Borellら 2007；Oginoら 2011），まだまだ不明な点が多く，今後は，この心拍変動の周波数解析について，快適性指標としての利用可能性を検討し，それを用いた飼育環境の快適性評価を行い，ストレス評価とあわせて，ウシにおける飼育環境の総合的な評価を行っていききたい．

第5章 摘要

本研究では、ウシにおいて、非侵襲的に採取できるスポット尿を用い、尿中コルチゾールレベルのストレス指標としての利用可能性について検討するとともに、それを用いて放牧牛のストレスを客観的に評価することを目的とした。

血液中コルチゾール濃度はストレス指標として広く用いられているが、採血行為や、それに伴う拘束および保定は、ウシにとって著しいストレスであり、そのことにより血液中コルチゾール濃度が高まる危険性がある。そこで、血液に代わって、非侵襲的かつ簡易に採取できるスポット尿を用い、尿中に含まれるコルチゾールのストレス指標としての利用可能性について検討した。ウシに副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）を投与し、人為的に血液中コルチゾール濃度を高めると、尿中クレアチニンに対する比で表した尿中コルチゾールレベルも同様に高まった。また、時間の経過とともに血液中コルチゾール濃度が低下すると、尿中コルチゾールレベルも同様に低下した。このように、尿中コルチゾールレベルは、血液中コルチゾール濃度の変化を非常によく反映していた。次に、明らかなストレスをウシに負荷し、その時の尿中コルチゾールレベルを調べた。すなわち、精神的ストレスとして社会的隔離を、身体的（および精神的）ストレスとして除角や去勢をウシに施し、その時の尿中コルチゾールレベルを調べた。その結果、いずれの負荷に対しても尿中コルチゾールレベルの上昇が確認された。以上のことから、ウシにおいて、尿中コルチゾールレベルは、血液中コルチゾール濃度に代わるストレス指標として利用可能であると考えられた。

放牧は、舎飼いと比較し、ウシにとってストレスの少ない飼育方式であると一般的に考えられているが、主観的、経験的知識によるものであり、科学的根拠は薄い。放牧牛のストレスレベルを客観的に評価することは、放牧普及のた

めの施策やアニマルウェルフェア研究の観点からも非常に重要である。ヒトとの関係が希薄になりがちな放牧牛では、採血に伴う行為が特に極度のストレスとなり、血液中コルチゾール濃度をストレス指標として用いることは難しい。そこで、前述の尿中コルチゾールレベルを用い、放牧および舎飼い飼育下におけるウシのストレスレベルを調べた。伝統的に夏山冬里方式で飼育され、放牧適性があると考えられている日本短角種と、乳量向上に向けて飛躍的に改良されてきたホルスタイン種を対象牛とした。その結果、日本短角種とホルスタイン種では反応に違いが見られた。すなわち、日本短角種では、一時的な反応の場合もあるが、舎飼い飼育下の方が放牧飼育下よりも尿中コルチゾールレベルは高かった。一方、ホルスタイン種では、放牧飼育下の方が舎飼い飼育下よりも尿中コルチゾールレベルは高かった。このことから、日本短角種では、放牧よりも舎飼いの方がストレスレベルの高い飼育方式であり、逆にホルスタイン種では、舎飼いよりも放牧の方がストレスレベルの高い飼育方式であることが示唆された。さらに、ホルスタイン種では、暑熱ストレスが加わると、尿中コルチゾールレベルは放牧時において上昇したが、舎飼い時にその変化は見られなかった。一方、日本短角種では、暑熱ストレスが加わっても尿中コルチゾールレベルに変化は見られなかった。ホルスタイン種は暑熱に弱い品種であるが、特に放牧環境において暑熱ストレスの影響を受けやすいことが明らかとなった。以上のことから、同じウシでも、品種によって飼育方式に対するストレスレベルは異なることが示された。また、暑熱ストレスに対する反応が品種で異なることはこれまでに報告されているが、その反応には飼育方式が影響を及ぼすことが示された。

以上のように、スポット尿を用いた尿中コルチゾールレベルは、ウシにおけるストレス指標として有効であり、その測定のための試料採取が簡易であることから、現場での応用も期待される。また、ウシにとって、放牧は無条件でス

ストレスの少ない快適な飼育方式であるとは言えず、特にホルスタイン種を夏季に放牧する際には、十分な暑熱対策を講じる必要があると考えられた。本研究は、ウシにおける飼育環境の改善のための基礎的知見となり、ストレスの少ない飼育環境が実現されることによって生産性の向上につながると考えられる。

謝辞

本論文を執筆するに際して、終始懇切なご指導とご助言を賜った、岩手大学大学院連合農学研究科生物生産科学専攻動物生産学連合講座教授 松崎正敏博士に深甚な感謝を表します。また、本論文の校閲の労を賜った同教授 深澤充博士，同教授 堀口健一博士，同准教授 出口善隆博士に心から感謝申し上げます。

また、本論文を執筆する機会を与えてくださった、東北農業研究センター畜産飼料作研究領域 押部明德領域長，同領域 渡邊彰上席研究員には終始適切な援助と暖かい励ましを頂きました。ここに深く感謝申し上げます。

本研究の遂行にあたり、元畜産草地研究所草地研究監 梨木守博士には牛の放牧に関する全般についてご指導いただくとともに、終始適切な助言と暖かい励ましを頂きました。畜産草地研究所飼料作物研究領域 菅野勉上席研究員，元東北農業研究センター主任研究員 故成田大展博士，東北農業研究センター畜産飼料作研究領域 東山雅一主任研究員，池田堅太郎主任研究員，小松篤司主任研究員，川崎光代主任研究員，北海道農業研究センター酪農研究領域 上田靖子主任研究員，朝隈貞樹主任研究員，畜産草地研究所草地管理研究領域 秋山典昭上席研究員にはご協力とご助言を頂きました。ここに厚く感謝の意を表します。

また、東北農業研究センターの諸氏には多大なご尽力をいただきました。とりわけ、業務第二科職員の皆様には供試牛の管理および実験の実施に多大なご協力を頂きました。元非常勤職員の坂本充子氏，非常勤職員の佐藤幸子氏には試料採取に関して多大なご協力を頂きました。ここに心からのお礼を申し上げます。

最後に、常に暖かく見守ってくれた家族に心から感謝いたします。

Summary

The objectives of this study were to assess the use of urinary cortisol to monitor adrenal activity in cattle using spot urine samples, which could be collected non-invasively, and to investigate the stress levels of cattle under outdoor grazing using urinary cortisol as an indicator of stress.

In mammals, stress is usually assessed by the level of plasma cortisol, which is secreted by the adrenal gland in response to activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. However, capturing and blood sampling are themselves known to cause a rise in the cortisol levels. Therefore, non-invasive sampling procedure such as the determination of cortisol in urine instead of in blood were investigated. First, urine samples were collected following an adrenocorticotrophic hormone (ACTH) challenge, and cortisol levels in urine were compared with the levels in plasma. Urinary cortisol levels, which were calculated by dividing urinary cortisol concentrations by urinary creatinine concentrations to correct urine dilution, showed a pattern of changes similar to that of plasma with a 0.5-h temporal lag time, and peak levels after the ACTH challenge were 4 to 10 times higher than the basal levels. Second, we investigated urinary cortisol levels of cattle in response to actual stressors; social isolation as a mental stressor and dehorned or castration as a physical stressor. In response to these stressors, urinary cortisol levels were significantly increased compared with basal levels. These results indicated that the cortisol levels in the urine were available for use to monitor HPA activity in cattle.

Grazing is generally thought to have a better 'image' in terms of the animal welfare, partly because the animals on pasture seem to be free to perform a wide range of species-specific behaviors. So far, however, very few studies have focused on the physiological stress responses of cattle during outdoor grazing. Evaluating stress levels of grazing cattle will contribute to animal welfare research as well as to government policies to promote grazing system for farmers in Japan. Therefore, we investigated the differences in the physiological stress responses of cattle between under outdoor grazing and indoor housing using urinary cortisol levels as a stress indicator. We used 2 cattle breeds as experimental animals. One is Japanese Shorthorn cattle, which are traditionally grazed on natural highland grassland, and the other is Holstein cattle, which have been highly improved primarily for milk production and are the highest milk producing cattle in the world. For Japanese Shorthorn cattle, the urinary cortisol levels were lower in the grazing compared to the indoor housing, although these responses were temporary in some case. For Holstein cattle, the urinary cortisol levels were higher in the grazing than in the indoor housing. These findings imply that there may be differences in the responses to breeding systems of Holstein and Japanese Shorthorn cattle, with Japanese Shorthorn cattle being expected to show lower stress levels when grazed, and with Holstein cattle under indoor housing system. In addition, the urinary cortisol levels for Holstein cattle were higher in the Temperature-Humidity Index (THI) ≥ 72 condition group than in the THI < 72 only in the grazing, not in the indoor housing. For Japanese Shorthorn cattle, the urinary cortisol levels did not differ significantly between the 2

THI condition groups, regardless of the breeding system. The results of the present study indicated that Holstein cattle were more sensitive to heat stress than were Japanese Shorthorn cattle, especially when reared on pasture. Our findings also indicated that the presence of breed differences in response to the breeding system and (or) heat stress.

In conclusion, the cortisol levels in spot urine samples were practical alternative to the cortisol levels in plasma with a non-invasive sampling method for cattle. It is also expected to use them on livestock farmers because of easy sampling method. In addition, it showed that grazing is not necessarily stressless breeding system for cattle, and that summer grazing, even under climatic conditions not considered to be extreme, induces some physiological stress responses in Holstein cattle. However, this does not mean that summer grazing is not important for cattle. We suggest the use of management to avoid heat stress, such as providing access to pasture at night and providing better access to shade. These results are useful information for improvement of breeding system for cattle, which contribute to improvement of animal production.

引用文献

- Adeyemo O, Heath E, Adadevoh BK, Steinbach J. 1981. Plasma-cortisol in bos-taurus and bos-indicus heifers in seasonal tropical climate. *Journal of Dairy Science* 64, 1586-1592.
- Alvarez MB, Johnson HD. 1970. Urinary excretion of adrenaline and noradrenaline in cattle during heat and cold exposure. *Journal of Dairy Science* 53, 928-930.
- Anestis SF. 2005. Behavioral style, dominance rank, and urinary cortisol in young chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Behaviour* 142, 1245-1268.
- Anestis SF. 2009. Urinary cortisol responses to unusual events in captive chimpanzees (*Pan troglodytes*). *Stress-the International Journal on the Biology of Stress* 12, 49-57.
- Antignac JP, Le Bizec B, Monteau F, Andre F. 2002. Study of natural and artificial corticosteroid phase II metabolites in bovine urine using HPLC-MS/MS. *Steroids* 67, 873-882.
- Apple JK, Dikeman ME, Minton JE, McMurphy RM, Fedde MR, Leith DE, Unruh JA. 1995. Effects of restraint and isolation stress and epidural blockade on endocrine and blood metabolite status, muscle glycogen-metabolism, and incidence of dark-cutting longissimus muscle of sheep. *Journal of Animal Science* 73, 2295-2307.
- Asakuma S, Ueda Y, Akiyama F, Uemura Y, Miyaji M, Nakamura M, Murai M, Urashima T. 2010. Short communication: Effect of grazing on the concentrations of total sialic acid and hexose in bovine milk. *Journal of Dairy Science* 93, 4850-4854.

- Barnett JL, Hemsworth PH, Cronin GM, Winfield CG, McCallum TH, Newman EA 1988. The effects of genotype on physiological and behavioral-responses related to the welfare of pregnant pigs. *Applied Animal Behaviour Science* 20, 287-296.
- Bernabucci U, Lacetera N, Baumgard LH, Rhoads RP, Ronchi B, Nardone A. 2010. Metabolic and hormonal acclimation to heat stress in domesticated ruminants. *Animal* 4, 1167-1183.
- Blackwell EJ, Bodnariu A, Tyson J, Bradshaw JWS, Casey RA. 2010. Rapid shaping of behaviour associated with high urinary cortisol in domestic dogs. *Applied Animal Behaviour Science* 124, 113-120.
- Boissy A, LeNeindre P. 1997. Behavioral, cardiac and cortisol responses to brief peer separation and reunion in cattle. *Physiology and Behavior* 61, 693-699.
- Bouraoui R, Lahmar M, Majdoub A, Djemali M, Belyea R. 2002. The relationship of temperature-humidity index with milk production of dairy cows in a Mediterranean climate. *Animal Research* 51, 479-491.
- Bretschneider G. 2005. Effects of age and method of castration on performance and stress response of beef male cattle: A review. *Livestock Production Science* 97, 89-100.
- Brown-Brandl TM, Nienaber JA, Eigenberg RA, Mader TL, Morrow JL, Dailey JW. 2006. Comparison of heat tolerance of feedlot heifers of different breeds. *Livestock Science* 105, 19-26.
- Cannon WB. 1932. *Wisdom of the body* 2nd edn. W. W. Norton, New York.
- Chaiyabutr N, Chanpongsang S, Suadsong S. 2008. Effects of evaporative cooling on the regulation of body water and milk production in crossbred

- Holstein cattle in a tropical environment. *International Journal of Biometeorology* 52, 575-585.
- Charlton GL, Rutter SM, East M, Sinclair LA. 2011a. Preference of dairy cows: Indoor cubicle housing with access to a total mixed ration vs. access to pasture. *Applied Animal Behaviour Science* 130, 1-9.
- Charlton GL, Rutter SM, East M, Sinclair LA. 2011b. Effects of providing total mixed rations indoors and on pasture on the behavior of lactating dairy cattle and their preference to be indoors or on pasture. *Journal of Dairy Science* 94, 3875-3884.
- Correa-Calderon A, Armstrong D, Ray D, DeNise S, Enns M, Howison C. 2004. Thermoregulatory responses of Holstein and Brown Swiss Heat-Stressed dairy cows to two different cooling systems. *International Journal of Biometeorology* 48, 142-148.
- Davenport MD, Tiefenbacher S, Lutz CK, Novak MA, Meyer JS. 2006. Analysis of endogenous cortisol concentrations in the hair of rhesus macaques. *General and Comparative Endocrinology* 147, 255-261.
- 出口善隆, 東山由美, 成田大展, 梨木守, 川崎光代, 荒川亜矢子, 平田統一. 2007. 耕作放棄水田跡地放牧における社会行動と尿中コルチゾール濃度. 日本家畜管理学会誌・応用動物行動学会誌 43, 185-191.
- 出口善隆, 東山由美. 2008. 東北地域における耕作放棄地の草地化とミニ放牧技術の開発 III-1 ストレスフリー牛群編成によるミニ放牧技術の開発. 東北農業研究センター研究報告 109, 92-95.
- Dehnhard M. 2007. Characterisation of the sympathetic nervous system of Asian (*Elephas maximus*) and African (*Loxodonta africana*) elephants based on urinary catecholamine analyses. *General and Comparative Endocrinology*

151, 274-284.

Dougherty CT, Knapp FW, Burrus PB, Willis DC, Cornelius PL, Bradley NW.

1993. Multiple releases of stable flies (*Stomoxys calcitrans* L.) and behavior of grazing beef-cattle. *Applied Animal Behaviour Science* 38, 191-212.

Elvinger F, Natzke RP, Hansen PJ. 1992. Interactions of heat-stress and bovine somatotropin affecting physiology and immunology of lactating cows. *Journal of Dairy Science* 75, 449-462.

Falk AC, Weary DM, Winckler C, von Keyserlingk MAG. 2012. Preference for pasture versus freestall housing by dairy cattle when stall availability indoors is reduced. *Journal of Dairy Science* 95, 6409-6415.

Fisher AD, Verkerk GA, Morrow CJ, Matthews LR. 2002. The effects of feed restriction and lying deprivation on pituitary-adrenal axis regulation in lactating cows. *Livestock Production Science* 73, 255-263.

Foury A, Devillers T, Sanchez MP, Griffon H, Le Roy P, Mormede P. 2005. Stress hormones, carcass composition and meat quality in Large White x Duroc pigs. *Meat Science* 69, 703-707.

Foury A, Geverink NA, Gil M, Gispert M, Hortos M, Furnols MFI, Carrion D, Blott SC, Plastow GS, Mormede P. 2007. Stress neuroendocrine profiles in five pig breeding lines and the relationship with carcass composition. *Animal* 1, 973-982.

深澤充, 小松篤司, 東山由美, 加藤真姫子, 阿保洋一, 山口直己. 2013. 北東北地域の酪農現場における暑熱の影響の実態調査. 日本家畜管理学会誌・応用動物行動学会誌 49, 153-163.

Fukasawa M, Tsukada H, Kosako T, Yamada A. 2008. Effect of lactation stage, season and parity on milk cortisol concentration in Holstein cows. *Livestock*

Science 113, 280-284.

Garcia-Belenguer S, Palacio J, Gascon M, Acena C, Revilla R, Mormede P. 1996.

Differences in the biological stress responses of two cattle breeds to walking up to mountain pastures in the Pyrenees. *Veterinary Research* 27, 515-526.

Garcia-Peniche TB, Cassell BG, Pearson RE, Misztal I. 2005. Comparisons of

Holsteins with Brown Swiss and Jersey Cows on the same farm for age at first calving and first calving interval. *Journal of Dairy Science* 88, 790-796.

Grigor PN, Cockram MS, Steele WB, Le Sueur CJ, Forsyth RE, Guthrie JA,

Johnson AK, Sandilands V, Reid HW, Sinclair C, Brown HK. 2001. Effects of space allowance during transport and duration of mid-journey lairage period on the physiological, behavioural and immunological responses of young calves during and after transport. *Animal Science* 73, 341-360.

Hahn GL. 1999. Dynamic responses of cattle to thermal heat loads. *Journal of Animal Science* 77, 10-20.

Hay M, Meunier-Salaun MC, Brulaud F, Monnier M, Mormede P. 2000.

Assessment of hypothalamic-pituitary-adrenal axis and sympathetic nervous system activity in pregnant sows through the measurement of glucocorticoids and catecholamines in urine. *Journal of Animal Science* 78, 420-428.

Hay M, Mormede P. 1998. Urinary excretion of catecholamines, cortisol and

their metabolites in Meishan and Large White sows: validation as a non-invasive and integrative assessment of adrenocortical and sympathoadrenal axis activity. *Veterinary Research* 29, 119-128.

早野順一郎. 2009. 日常生活下の生体情報モニタリング：ホルター心電図から見える未来像. *Nagoya Medical Journal* 50, 93-99.

- Hemsworth PH, Barnett JL, Beveridge L, Matthews LR. 1995. The welfare of extensively managed dairy-cattle - A review. *Applied Animal Behaviour Science* 42, 161-182.
- Hernandez-Mendo O, von Keyserlingk MAG, Veira DM, Weary DM. 2007. Effects of pasture on lameness in dairy cows. *Journal of Dairy Science* 90, 1209-1214.
- 樋口隆. 2000. ストレスとホルモン. In: 日本比較内分泌学会 (編), からだの中からストレスをみる, pp. 39-70. 学会出版センター, 東京.
- 堀井隆行, 植竹勝治, 金田京子, 田中智夫. 2003. 動物介在活動中のイヌの行動と尿中カテコールアミン濃度によるストレス評価. *日本畜産学会報* 74, 375-381.
- Hopster H, Blokhuis HJ. 1994. Validation of a heart-rate monitor for measuring a stress response in dairy cows. *Canadian Journal of Animal Science* 74, 465-474.
- Hopster H, van der Werf JTN, Erkens JHF, Blokhuis HJ. 1999. Effects of repeated jugular puncture on plasma cortisol concentrations in loose-housed dairy cows. *Journal of Animal Science* 77, 708-714.
- Hultgren J. 2001. Effects of two stall flooring systems on the behaviour of tied dairy cows. *Applied Animal Behaviour Science* 73, 167-177.
- 井上広子, 桑野稔子. 2013. 幼児とその保護者のスポット尿中コルチゾール濃度とストレス評価との関連. *教育医学* 58, 264-273.
- 伊藤佳保里, 佐伯香織, 沼野美沙紀, 篠田貢一, 藤井徹也. 2009. ラベンダーオイルを用いた足浴が生体に及ぼす影響. *形態・機能* 7, 59-66.
- James GD, Gastrich HJ, Valdimarsdottir HB, Bovbjerg DH. 2008. The rate of urinary cortisol excretion at work is persistently elevated in women at

- familial risk for breast cancer. *American Journal of Human Biology* 20, 478-480.
- 家畜改良事業団. 2012. 乳用牛群能力検定成績のまとめ. 乳用牛群検定全国協議会, 東京.
- 仮屋喜弘, 石崎弘, 花房泰子, 黒川由紀江, 谷本朱紀. 2005. 放牧馴致と呼吸器病などの疾病や日増体量との関係. 畜産の研究 59, 122-126.
- 川村祐一郎. 2010. 自律神経活動と心疾患—特に不整脈発生との関連—. 旭川医科大学研究フォーラム 11, 37-45.
- 川手督也. 2008. 地方特定品種の特性と今日的意義, 課題—日本短角種を中心に—. び〜ふキャトル 11, 28-30.
- Kilgour RJ. 2012. In pursuit of "normal": A review of the behaviour of cattle at pasture. *Applied Animal Behaviour Science* 138, 1-11.
- Klante G, Brinschwitz T, Secci K, Wollnik E, Steinlechner S. 1997. Creatinine is an appropriate reference for urinary sulphatoxymelatonin of laboratory animals and humans. *Journal of Pineal Research* 23, 191-197.
- 近藤誠司. 2013. 放牧飼育が家畜の福祉に及ぼす影響. 畜産コンサルタント 49, 20-24.
- Kondo S, Takahashi M, Mitani T, Kashiwabara H, Ueda K, Nakatsuji H. 2007. Differences of lying-standing action and locomotion posture between cows kept pasture and in cowshed. Proc. 41st Int. Congr. ISAE, Merida, Mexico, p. 96.
- 神戸川明. 1977. 化学的測定法. In: 日本生化学会 (編), 生化学実験講座 16—ホルモン上—, 第 1 版, pp. 141-155. 東京化学同人, 東京.
- Krohn CC, Munksgaard L, Jonassen B. 1992. Behavior of dairy-cows kept in extensive (loose housing pasture) or intensive (tie stall) environments. I.

- Experimental procedure, facilities, time budgets - diurnal and seasonal conditions. *Applied Animal Behaviour Science* 34, 37-47.
- Krohn CC, Munksgaard L. 1993. Behavior of dairy-cows kept in extensive (loose housing pasture) or intensive (tie stall) environments. II. Lying and lying-down behavior. *Applied Animal Behaviour Science* 37, 1-16.
- 熊谷朗, 七星正久. 1969. 糖質ステロイド. In: 熊原雄一, 垂井清一郎 (編), 血中ホルモン—測定法・意義・臨床—, 第1版, pp. 260-302. 医学書院, 東京.
- 桑野由紀, 勝浦桜子, 増田清士, 棚橋俊仁, 六反一仁. 2010. メンタルヘルスを支える新たなストレスバイオマーカー. 四国医学雑誌 66, 119-122.
- Ladewig J, Smidt D. 1989. Behavior, episodic secretion of cortisol, and adrenocortical reactivity in bulls subjected to tethering. *Hormones and Behavior* 23, 344-360.
- Legrand AL, von Keyserlingk MAG, Weary DM. 2009. Preference and usage of pasture versus free-stall housing by lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 92, 3651-3658.
- Lichtsteiner M, Turner DC. 2008. Influence of indoor-cat group size and dominance rank on urinary cortisol levels. *Animal Welfare* 17, 215-237.
- Lidfors L. 1989. The use of getting up and lying down movements in the evaluation of cattle environments. *Veterinary Research Communications* 13, 307-324.
- Lindholm J, Schultzm-Möller. 1973. Plasma and urinary cortisol in pregnancy and during estrogen-gestagen treatment. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 31, 119-122.
- Lowe TE, Devine CE, Wells RW, Lynch LL. 2004. The relationship between postmortem urinary catecholamines, meat ultimate pH, and shear force in

- bulls and cows. *Meat Science* 67, 251-260.
- 前原俊浩, 堤知子, 梅北信二郎. 1993. 肉用牛黒毛和種肥育における除角の効果. 鹿児島県畜産試験場研究報告 25, 83-87.
- Mateo JM, Cavigelli SA. 2005. A validation of extraction methods for noninvasive sampling of glucocorticoids in free-living ground squirrels. *Physiological and Biochemical Zoology* 78, 1069-1084.
- 松川正, 今村照久. 1976. 環境温度の変化に伴う生理反応の日本短角種と黒毛和種の差について. 東北農業試験場研究速報 20, 59-62.
- Miller MW, Hobbs NT, Sousa MC. 1991. Detecting stress responses in Rocky Mountain bighorn sheep (*Ovis canadensis canadensis*): reliability of cortisol concentrations in urine and feces. *Canadian Journal of Zoology* 69, 15-24.
- Minton JE. 1994. Function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and the sympathetic nervous-system in models of acute stress in domestic farm animals. *Journal of Animal Science* 72, 1891-1898.
- Molony V, Kent JE, Robertson IS. 1995. Assessment of acute and chronic pain after different methods of castration of calves. *Applied Animal Behaviour Science* 46, 33-48.
- Mormede P, Andanson S, Auperin B, Beerda B, Guemene D, Malmkvist J, Manteca X, Manteuffel G, Prunet P, van Reenen CG, Richard S, Veissier I. 2007. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiology and Behavior* 92, 317-339.
- Morrow CJ, Kolver ES, Verkerk GA, Matthews LR. 2002. Fecal glucocorticoid metabolites as a measure of adrenal activity in dairy cattle. *General and Comparative Endocrinology* 126, 229-241.
- Morton DJ, Anderson E, Foggin CM, Kock MD, Tiran EP. 1995. Plasma cortisol

- as an indicator of stress due to capture and translocation in wildlife species. *Veterinary Record* 136, 60-63.
- Möstl E, Messmann S, Bagu E, Robia C, Palme R. 1999. Measurement of glucocorticoid metabolite concentrations in faeces of domestic livestock. *Journal of Veterinary Medicine Series a-Physiology Pathology Clinical Medicine* 46, 621-631.
- Möstl E, Palme, R. 2002. Hormones as indicators of stress. *Domestic Animal Endocrinology* 23, 67-74.
- 本江昭夫. 2009. 家畜とは何か. In: 山本紀夫 (編), ドメスティケーション—その民族生物学的研究, 国立民族学博物館調査報告 84, pp.97-115. 国立民族学博物館, 大阪.
- Muchenje V, Dzama K, Chimonyo M, Strydom PE, Raats JG. 2009. Relationship between pre-slaughter stress responsiveness and beef quality in three cattle breeds. *Meat Science* 81, 653-657.
- Muller MN, Wrangham RW. 2004. Dominance, cortisol and stress in wild chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 55, 332-340.
- Munksgaard L, Simonsen HB. 1996. Behavioral and pituitary adrenal-axis responses of dairy cows to social isolation and deprivation of lying down. *Journal of Animal Science* 74, 769-778.
- Nakamura M, Nemoto T. 1992. Urinary excretion of adrenaline and noradrenaline in Holstein calves during heat and cold exposure. *Animal Science and Technology (Jpn)* 63, 1134-1141.
- 中村彰治, 丹信介, 富士岡隆. 2010. ストレスと神経. In: 日本比較内分泌学会 (編), からだの中からストレスをみる, pp. 39-70. 学会出版センター, 東

京.

Negrao JA, Porcionato MA, de Passille AM, Rushen J. 2004. Cortisol in saliva and plasma of cattle after ACTH administration and milking. *Journal of Dairy Science* 87, 1713-1718.

二木鋭雄. 2007. 良いストレス悪いストレス. In: 尾中達史, 井樋慶一, 神庭重信, 二木鋭雄 (編), ストレスの化学, pp. 62-65. ライフサイエンス出版, 東京.

農林水産省. 2010. 酪農及び肉用牛生産の近代化を図るための基本方針. 農林水産省, 東京.

農林水産省大臣官房統計部生産流通消費統計課. 2013. 畜産統計調査. 農林水産省, 東京, [2014年5月15日引用].
<http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/tikusan/index.html>

農林水産省生産局畜産部畜産振興課, 農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課. 2013. 飼料をめぐる情勢, p. 1. 農林水産省, 東京.

農林水産省農林水産技術会議事務局 (編). 1999. 日本飼養標準・乳牛 (1999年版). 中央畜産会, 東京.

O'connell J, Giller PS, Meaney W. 1989. A comparison of dairy cattle behavioral patterns at pasture and during confinement. *Irish Journal of Agricultural Research* 28, 65-72.

Odore R, D'Angelo A, Badino P, Bellino C, Pagliasso S, Re G. 2004. Road transportation affects blood hormone levels and lymphocyte glucocorticoid and beta-adrenergic receptor concentrations in calves. *Veterinary Journal* 168, 297-303.

Ogino M, Yamazaki A, Matsuura A, Irimajiri Mami, Hodate K. 2011. Physiological and behavioral responses to social isolation and

- transportation in calves. *Animal Behaviour and Management* 47, 12-20.
- Ohashi A, Yamada Y, Sakaguchi K, Inoue T, Kubo M, Fushimi H. 2001. A natural history of adrenocorticotropin-independent bilateral adrenal macronodular hyperplasia (AIMAH) from preclinical to clinically overt Cushing's syndrome. *Endocrine Journal* 48, 677-683.
- 小倉太一. 2012. 好みの音楽聴取は Mental-Workload 後の自律神経機能の変化に影響を与える. 健康科学大学紀要 9, 23-31.
- O'Neill HA, Webb EC, Frylinck L, Strydom P. 2012. Urinary catecholamine concentrations in three beef breeds at slaughter. *South African Journal of Animal Science* 42 (Suppl. 1), 545-549.
- 大城政一, 佐々木康之, 浜崎正雄, 津田恒之. 1978. 環境温度の変化にともなうメン羊の一般生理諸元と尿中カテコールアミン排泄量の変動. 日本畜産学会報 49, 473-479.
- Österman S, Redbo I. 2001. Effects of milking frequency on lying down and getting up behaviour in dairy cows. *Applied Animal Behaviour Science* 70, 167-176.
- Pavlovic R, Cannizzo FT, Panseri S, Biolatti B, Trutic N, Biondi PA, Chiesa L. 2013. Tetrahydro-metabolites of cortisol and cortisone in bovine urine evaluated by HPLC-ESI-mass spectrometry. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 135, 30-35.
- Payne E, Cope BC, Hughes JM, Phipps DE. 1992. The metabolism of noradrenaline in the sheep and the effect of dry-matter intake upon the production of a metabolite, urinary vanillymandelic acid. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology and Endocrinology* 101, 661-664.

- Peric T, Comin A, Corazzin M, Montillo M, Cappa A, Campanile G, Prandi A. 2013. Short communication: Hair cortisol concentrations in Holstein-Friesian and crossbreed F-1 heifers. *Journal of Dairy Science* 96, 3023-3027.
- Prendiville R, Lewis E, Pierce KM, Buckley F. 2010. Comparative grazing behavior of lactating Holstein-Friesian, Jersey, and Jersey x Holstein-Friesian dairy cows and its association with intake capacity and production efficiency. *Journal of Dairy Science* 93, 764-774.
- Ravagnolo O, Misztal I, Hoogenboom G. 2000. Genetic component of heat stress in dairy cattle, development of heat index function. *Journal of Dairy Science* 83, 2120-2125.
- Redbo I. 1990. Changes in duration and frequency of stereotypies and their adjoining behaviors in heifers, before, during and after the grazing period. *Applied Animal Behaviour Science* 26, 57-67.
- Redbo I. 1993. Stereotypies and cortisol secretion in heifers subjected to tethering. *Applied Animal Behaviour Science* 38, 213-225.
- Ruckebusch Y, Bueno L. 1978. Analysis of ingestive behavior and activity of cattle under field conditions. *Applied Animal Ethology* 4, 301-313.
- Rushen J, Boissy A, Terlouw EMC, de Passille AMB. 1999. Opioid peptides and behavioral and physiological responses of dairy cows to social isolation in unfamiliar surroundings. *Journal of Animal Science* 77, 2918-2924.
- Sasaki Y, Oshiro S, Miura M, Tsuda T. 1973. Effect of heat exposure on urinary excretion of noradrenaline and adrenaline in sheep. *Japan Journal of Zootechnology Science* 44, 248-257.
- 佐藤衆介. 2013. アニマルウェルフェアの国内外の情勢—EUの取り組み, 米国

- での動き，農林水産省と環境省の取り組みー。畜産コンサルタント 49, 12-15.
- 佐藤衆介，近藤誠司。2002. 社会構造ーウシー。In: 佐藤衆介，近藤誠司，田中智夫，楠瀬良（編），家畜行動学図説，第1版，pp. 98-101. 朝倉書店，東京.
- Selye H. 1946. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 6, 117-230.
- 瀬尾哲也。2010. 日本型アニマルウェルフェア（家畜福祉）構築の取り組みー乳牛を中心としてー。プロダクションメディスン研究フォーラム。函館，日本（講演要旨）。
- Sharma AK, Rodriguez LA, Mekonnen G, Wilcox CJ, Bachman KC, Collier RJ. 1983. Climatological and genetic effects on milk composition and yield. *Journal of Dairy Science* 66, 119-126.
- Silanikove N. 2000. Effects of heat stress on the welfare of extensively managed domestic ruminants. *Livestock Production Science* 67, 1-18.
- 白尾大司，澤井利幸，藤井宏志。2000. 黒毛和種における早期除角の労力性および牛への増体性，行動，生理に及ぼす影響。山口獣医学雑誌 27, 37-42.
- Stafford KJ, Mellor DJ. 2005. Dehorning and disbudding distress and its alleviation in calves. *Veterinary Journal* 169, 337-349.
- Steelman, C. D., Brown, A. H., Gbur, E. E. and Tolley, G. 1991. Interactive response of the horn fly (Diptera: Muscidae) and selected breeds of beef cattle. *Journal of Economic Entomology* 84, 1275-1282.
- Stelwagen K, van Espen DC, Verkerk GA, McFadden HA, Farr VC. 1998. Elevated plasma cortisol reduces permeability of mammary tight junctions in the lactating bovine mammary epithelium. *Journal of Endocrinology* 159, 173-178.

- Stewart M, Verkerk GA, Stafford KJ, Schaefer AL, Webster JR. 2010. Noninvasive assessment of autonomic activity for evaluation of pain in calves, using surgical castration as a model. *Journal of Dairy Science* 93, 3602-3609.
- 高安一郎. 1983. 日本短角種の成立と改良経過に関する研究. 弘前大学農学部学術報告 40, 37-108.
- 玉城政信, 後藤英子, 島袋宏俊, 知念雅昭, 小尾岳士. 2006. 観血去勢法とゴム去勢法の違いが子牛の発育に及ぼす影響. 琉球大学農学部学術報告 53, 7-9.
- Taniyama M, Honma K, Ban Y. 1993. Urinary cortisol metabolites in the assessment of peripheral thyroid hormone action -application for diagnosis of resistance to thyroid hormone. *Thyroid* 3, 229-233.
- Terlouw EMC, Schouten WGP, Ladewig J. 2009. 生理学的側面. In: Appleby MC, Hughes BC. (eds), (監修, 佐藤衆介, 森裕司), 動物への配慮の科学—アニマルウェルフェアをめざして—, pp. 151-166. チクサン出版社, 東京.
- Titulaer M, Blackwell EJ, Mendl M, Casey RA. 2013. Cross sectional study comparing behavioural, cognitive and physiological indicators of welfare between short and long term kennelled domestic dogs. *Applied Animal Behaviour Science* 147, 149-158.
- Trevisi E, Bertoni G. 2009. Some physiological and biochemical methods for acute and chronic stress evaluation in dairy cows. *Italian Journal of Animal Science* 8, 265-286.
- Trevisi E, Lombardelli L, Bionaz M, Bertoni G. 2005. Plasma cortisol level in relationship to welfare conditions in dairy cows. Proc. 56th Ann. Meet. EAAP, Uppsala, Sweden, 11, 106 (abstr.).
- 葛谷栄一. 2003. 放牧による中山間地域農業の活性化—放牧の持つ多面的利用

- 価値の活用一. 農林金融 56, 788-805.
- Ueda Y, Akiyama F, Asakuma S, Watanabe N. 2011. Technical note: The use of a physical activity monitor to estimate the eating time of cows in pasture. *Journal of Dairy Science* 94, 3498-3503.
- Uetake K, Goto A, Koyama R, Kikuchi R, Tanaka T. 2013. Effects of single caging and cage size on behavior and stress level of domestic neutered cats housed in an animal shelter. *Animal Science Journal* 84, 272-274.
- Uetake K, Tanaka T, Sato S. 2011. Effects of haul distance and stocking density on young suckling calves transported in Japan. *Animal Science Journal* 82, 587-590.
- van Reenen CG, Mars MH, Leushuis IE, Rijsewijk FAM, van Oirschot JT, Blokhuis HJ. 2000. Social isolation may influence responsiveness to infection with bovine herpesvirus 1 in veal calves. *Veterinary Microbiology* 75, 135-143.
- Verkerk GA, Macmillan KL, McLeay LM. 1994. Adrenal cortex response to adrenocorticotrophic hormone in dairy cattle. *Domestic Animal Endocrinology* 11, 115-123.
- Verkerk GA, Phipps AM, Carragher JF, Matthews LR, Stelwagen K. 1998. Characterization of milk cortisol concentrations as a measure of short-term stress responses in lactating dairy cows. *Animal Welfare* 7, 77-86.
- von Borell E, Langbein J, Després G, Hansen S, Leterrier C, Marchant-Forde J, Marchant-Forde R, Minero M, Mohr E, Prunier A, Valance D, Vissier I. 2007. Heart rate variability as a measure of autonomic regulation of cardiac activity for assessing stress and welfare in farm animals – a review. *Physiology and Behavior* 92, 293-316.

- Washburn SP, White SL, Green JT, Benson GA. 2002. Reproduction, mastitis, and body condition of seasonally calved Holstein and Jersey cows in confinement or pasture systems. *Journal of Dairy Science* 85, 105-111.
- Wohlt JE, Allyn ME, Zajac PK, Katz LS. 1994. Cortisol increases in plasma of holstein heifer calves from handling and method of electrical dehorning. *Journal of Dairy Science* 77, 3725-3729.
- 山田佳彦, 関原久彦. 2010. 11-ヒドロキシコルチコイド (11-OHCS) , 17-ヒドロキシコルチコイド (17-OHCS) . 日本臨牀 68, 381-385.
- 山口昌樹. 2007. 唾液マーカーでストレスを測る. In: 尾中達史, 井樋慶一, 神庭重信, 二木鋭雄 (編) , ストレスの化学, pp. 66-70. ライフサイエンス出版, 東京.
- Young T, Creighton E, Smith T, Hosie C. 2012. A novel scale of behavioural indicators of stress for use with domestic horses. *Applied Animal Behaviour Science* 140, 33-43.
- Zahner M, Schrader L, Hauser R, Keck M, Langhans W, Wechsler B. 2004. The influence of climatic conditions on physiological and behavioural parameters in dairy cows kept in open stables. *Animal Science* 78, 139-147.