

障碍者乗馬に用いる馬の特性評価と適性
に関する研究

2018年

渕上 真帆

目次

緒 論.....	3
第1章 馬の涙液を用いたコルチゾール濃度の測定.....	7
1. 序 論.....	7
2. 方 法.....	10
(1) 使用馬.....	10
(2) 採血および採涙.....	10
(3) 心拍測定.....	12
(4) 統計解析.....	12
3. 結 果.....	12
4. 考 察.....	13
5. 小 括.....	16
6. 図表等.....	17
第2章 涙液を用いた神経伝達物質の測定.....	23
1. 序 論.....	23
2. 方 法.....	25
(1) 使用馬.....	25
(2) 採血および採涙.....	25
(3) 心拍測定.....	27
(4) 統計方法.....	27
3. 結 果.....	28
4. 考 察.....	28
5. 小 括.....	31
6. 図表等.....	33
第3章馬の涙液を用いたオキシトシンの測定とドーパミン，コルチゾールとの関係.....	42

1. 序 論.....	42
2. 方 法.....	43
(1) 使用馬	43
(2) 採涙.....	44
(3) アンケート	45
(4) 統計処理.....	45
3. 結 果.....	46
4. 考 察.....	48
5. 小 括.....	50
6. 図表等	52
第4章 総 括.....	60
結 論.....	64
引用文献	66
摘 要.....	83
Summary	92
Introduction	92
Chapter 1: Measurement of Cortisol in Horse Tears	93
Chapter II: Measurement of Neurotransmitters in Horse Tears	95
Chapter III: Measurement of Oxytocin in Horse Tears and Relationship Between Oxytocin and Dopamine	96
Chapter IV: Conclusions	98
謝辞	100

緒 論

動物介在活動 (AAA: Animal Assisted Activity) や療法 (AAT: Animal Assisted Therapy) による効果に関して、様々な研究が行われてきた (Adams, 1997; Martin, et al., 2002)。人と動物の関係に関する国際組織 (IAHAIO: International Association of Human-Animal Interaction Organizations) では、人と動物の相互作用の正しい理解を促進させるために活動している。この組織では、1977年以降、3年ごとに人と動物の相互作用 (HAI: Human Animal Interaction) に関する研究発表およびディスカッションを行っている。また、日本においても、ヒトと動物の関係学会や、動物介在教育・療学会といった学会が主に人と動物の関係に関して研究発表を行っている。さらに民間においても動物介在活動を行っている団体も多く、主に犬や猫を用いて老人ホームをはじめとする福祉施設やホスピスとなどの医療機関、小学校をはじめとする教育機関など幅広い活動が行われている。これらの活動には、主に犬やハムスター、ウサギといった小動物が多く使われており、その中でも犬による介在療法や活動は多く、児童 (Caprilli et al., 2006) から高齢 (Kawamura et al., 2009) といった幅広い年代、自閉症 (Haire et al., 2014) やうつ病 (Souter et al., 2007)、注意欠陥多動性障害 (Mormede et al., 2002)、統合失調症 (Nathans et al., 2005) といった様々な対象者にむけ、国内外を問わず多くの活動が行われている。ペットと人との関係について、その健康上の効果を述べた研究は多く、高齢者の女性において、ペットとの愛着が高い飼い主は幸福度が高い (Ory et al., 1983) ことや、コンパニオンアニマルを持つことで孤独感が低減する (Zasloufr et al., 1994)、幸福感を促進する (Goldmeier et al., 1986; Serpell, 1996) など、肯定的な効果に関して多くの報告がある。かつてはその調査はアンケートや観察によるものが多く見受けられたが、動物と関わることの効果の評価方法として神経伝達物質やホルモンといった生理的指標は重要な証拠となりつつある。

このような多くの報告から、IAHAIO は 2007 年の東京大会において、「人が動物の存在

から恩恵を受けることは普遍的かつ自然な基本的人権である」との宣言を出し、動物による様々な効果は普遍的であると考えられている。

動物介在活動や療法には犬や猫といった小動物のほかに、大型動物の馬も使われている。乗馬療法や馬を用いた活動は欧米諸国で発展し、活発に行われている。障害者にも健常者と同じように乗馬や馬車操作を楽しむ機会を提供し、生活の質の向上を図ることを目的として設立された RDA (Riding for the Disabled Association) は、イギリス国内だけでなくオーストラリアやニュージーランド、マレーシアなど、日本を含めた世界各国で活動を行っている。さらに、ドイツではドイツ乗馬療法協会 (Deutsches Kuratorium für therapeutisches Reiten e.V.) が、アメリカには北米障害者乗馬協会を前身とする PATH (Professional Association of Therapeutic Horsemanship International) が活動を行っている。日本においては 1984 年に八木一明氏が活動をはじめ、1986 年に日本障害者乗馬連盟を設立、その後改組され 1995 年に一般社団法人日本障害者乗馬協会が発足、1998 年にイギリス RDA の一組織として RDA Japan や、栃木県にある特定非営利活動法人障害者のための馬事普及協会などの団体が精力的に活動を行っている。さらに、RDA Japan や障害者のための馬事普及協会等はインストラクター資格の認定も行っており、日本国内での障害者乗馬の普及に取り組んでいる。そのほかにも、一般社団法人アニマルセラピスト協会などといった数多くの団体が馬介在活動やいわゆるホースセラピーなどの活動を行っている。また、実践的な活動団体も多く、サイトウ乗馬苑や明石乗馬などの団体があり、日本各地で活動を行っている。

このように、馬を用いた AAA や AAT の活動は多くの団体が行っており、それらの活動に期待する効果としては身体的効果、社会的効果、精神的効果が得られると言われている (Chu et al., 2009)。身体的効果についてその歴史は古く、ローマ時代の文献にも残っているほどである (宮川, 2005)。古代ローマでは、負傷した兵士のリハビリとして乗馬が有効であることが述べられている。この時代では一人前の男性になることの一つに乗馬も含まれており、特に貴族階級の男性には乗馬は必須であったことから、乗馬や馬との関わりは

重要であったと考えられる。また、この時代ではすでに馬に対する接し方に関して記述されており、現代語訳での出版もされている。

障害者乗馬に関して、脳性まひ（Bertoti, 1988）や脳卒中患者（Han et al., 2012）などへの身体的効果としての乗馬療法がおこなわれていた。また、他の動物種と比べ、「乗る」ことによる効果は馬の最大の特徴であり、精神的効果として特別な一体感（青木ら, 2016）が得られることや、馬のような大きな動物を扱うことによる、自己肯定感の獲得（大塚, 2009）などの報告もある。また統合失調症への検証も行われており、症状の緩和や入院者数の減少といった臨床における実質的な効果も認められている（Scheidhacker, 1991）さらに自閉症スペクトラムの児童（美和ら, 2005）に対し、表情から分析した精神的効果に関する研究もなされている（慶野ら, 2008）。他にもうつ病などの精神疾患に対して高い効果が得られた報告（Burgon, 2003）もあり、馬を用いた介入活動や療法、教育は多くの研究によって支持されている。

一方で、障害者乗馬や馬介入活動における馬そのものの評価は、騎乗者に関する報告に比べて、極めて少ない。人と馬のストレス変化に関して、本番と練習では人と馬に反応の違いがあったこと（Lewinski et al., 2013）が報告されている一方、障害者乗馬用に使われる馬と一般の乗馬では、馬が感じるストレスは差がなかったという報告（Kaiser et al., 2006）などがある。また、人との活動に関して、馬の選択においてはインストラクターの主観に依存し、馬の体高や体重、サイドウォーカーや騎乗者の体格をもとに、あるいは馬の調教度合いを基準に選択している傾向にある。さらに、年齢は一般的に12歳前後が良いともいわれている。しかし、これらの評価に科学的指標はなく、主観的な経験から述べられている。

このように、馬が人と関わることで起こる変化に関して、犬や猫に比べると、いまだ解明されていないことが多い。ストレスや共感性に関する研究は観察や聞き取りといった主観的な評価のほかに、内的変化をもとに客観的な生理学的評価が用いられている（Holsboer et al., 2010）。生理学的評価において、ストレスによって分泌されるホルモンや神経伝達物質の測定には、主に血液などが用いられることが多い。しかし、これらは動物への負担が大

きく、頻繁な採取には動物への負担が少ない非侵襲的な手技による方法での評価が求められる。一方で非侵襲的に採取できるサンプルには心拍が用いられることが多いが、これは副次的な反応であることを考慮しなければならない。さらに尿や糞は即時的な採取が難しく、馬の唾液は採取後の処理が繁雑であり、いずれも一長一短がある。

これらのことから、本研究では、障害者乗馬や馬介在活動に使われる馬の適性評価と選択に着目した。現状では動物介在活動や療法に用いる馬は、インストラクターや飼育者の主観による選択が主である。しかし、馬が感じている、または反応している状態を生理的評価を用いて客観的に判断することは、馬を用いた活動には不可欠な要素となると考えられる。

本研究は障害者乗馬における馬の適性評価と選択を行うために、非侵襲的に評価できる新たな指標の検討を行い、障害者乗馬の分野に新たな知見をもたらすことを目的とした。

第1章 馬の涙液を用いたコルチゾール濃度の測定

1. 序 論

人が動物から受ける効果には、精神的効果 (Whalen et al., 2012) をはじめ社会的効果 (Bass et al., 2009) など様々な効果が得られる。人との関わりが深い様々な動物の中でも、馬と人との関わりは長く、使役動物としての役割は古い (川又, 2005)。その走行力や観察力をはじめとする馬の能力は高く、なかでも Clever Hans と呼ばれた馬のもつ能力は有名 (The nature of horses, 1997) である。この馬は「計算」もできることで一躍有名になったが、実際には周囲の人間の反応を観察して答えを得ていたことが判明し、馬の観察力の高さを証明した。これらの特性から馬の能力を期待して、様々な活用が取り組まれている。また馬に乗ることによる効果はローマ時代から認知され、乗馬のみならず様々な活動が行われてきた。

このような馬によってもたらされる効果は、特に様々な障害や疾患に有用であるといわれていることもあり、治療的乗馬 (津田 & 塚田, 2011) や、ホースセラピー (アショテフテリサ & ホルムストランドアサ., 2000)、馬介在活動 (要ら, 2004) などその活用は多岐にわたる。これらに関して、馬の揺れや一体感 (局, 2002)、体温 (淵上ら, 2012) などの人側から見た要因の検討は多くおこなわれているが、馬側の要因の解明はほとんど見受けられない。

馬側の要因を解明することは、馬の活用に貢献するのみにとどまらず、ホースセラピーや馬介在活動の詳細なプログラムの作成に不可欠である。また、馬は健常者や障害児の活動内容の違いに異なったストレス反応を示すことが報告されている (Kaiser et al., 2006)。他にも練習に比べ本番では馬も人もコルチゾールが上昇するといった報告もある (Von et al., 2013)。

介在活動に使われる動物種として馬の他にも、犬は多くの実践や研究で使われている。犬を用いた介在活動の研究では、カテコールアミンの変化が報告されている（植竹ら、2007）。この研究では、老人ホームへ訪問する犬のノルアドレナリンやアドレナリンの活動前後の上昇率の変化に着目しており、参加日数が増えるにつれて減少することが報告されている。馬の特性を評価する研究としては、「気質」（Lansade et al., 2008）や「行動評価」（Momozawa et al., 2010）「学習」（Lansade et al., 2010）に関するものが多く、これらの研究では馬はいずれも高い能力があることを報告している。気質に関する研究では、刺激物に対する馬の反応のみを評価するものや、ハンドラーからの促しによる刺激物への反応を人との関わりの有無によって評価している（Von et al., 2011）。刺激に対する反応では、行動遺伝学との関連を調べた研究もあり、馬の気質と遺伝子の配列には関係があることが報告されている（桃沢, 2007）。さらに、乗馬による子供への判断力や学習の効果に関する研究では、馬によって効果が異なることが分かった（Ohtani et al., 2017）。

ストレスの程度を評価する生理学的な研究では、主に心拍変動解析や液性サンプルを用いる。馬の平常時の心拍は一般的に 20～40bpm 程度といわれており、競走馬ではレースによって心拍数は 200bpm 以上になると言われている。このように馬の心拍は平常時と運動時との差が大きい。

ストレス刺激は「視床下部-下垂体前葉-副腎皮質」へと伝わる「HPA 系」と「視床下部-交感神経-副腎髄質系」へと伝わる「SAM 系」とがある。これらが刺激されると、ストレスマーカーであるカテコールアミンや糖質コルチコイドが分泌される。これらの生理的ストレス反応を調べるために馬の頸静脈に穿刺し血液をサンプルとして利用することが多く見受けられるが、一方で穿刺による痛みが存在する（田中&脇田ら, 2010）。そのため、穿刺による侵襲的な方法ではなく、非侵襲的な方法を工夫することは、動物のためにも重要である。ストレスマーカーによる研究は血液（Urhausen et al., 1995）のほかには尿（Yamaguchi et al., 2002）や唾液（Van et al., 2002）を用いて研究が行われている。ストレスマーカーとして唾液や尿が使われる理由としては、非侵襲的に採取できることに加

え、血液から唾液へと移行する成分の一つにコルチゾールなどが含まれるからである。馬における唾液中と血液中のコルチゾールの濃度を検証した論文には、輸送ストレス (Nachreiner et al., 2001) や新馬のトレーニングに関するもの (Schmidt et al., 2010) がある。

尿も唾液と同じように非侵襲的に測定が可能ではあるが、リアルタイムでの測定が難しいことやクレアチニン補正も必要になる (田中 & 脇田, 2011)。同様に、唾液は口腔内環境によって汚染や希釈等が懸念される。そのため尿や唾液に関しては採取前の注意事項や前処理の工程が多くあり、このことは得られた濃度の信頼性にも関わる。

さらに馬は人と同じように汗をかく動物である。汗を用いたものでは、輸送による電解質の成分変化に関する研究がある (Mccutcheon et al., 1995)。より有用な汗の採取方法と場所を検討した研究もあるが、乾燥による濃縮など課題もみられた (長谷川ら, 1999)。

涙液は血液から生成され、成分中には血液由来のホルモンなどのたんぱく質や電解質が含まれていることが一般的に知られている (標準生理学, P266)。涙液中のホルモンの測定に関して、ハタネズミに性ホルモンを投薬し、涙液からその効果を観たとの報告 (佐々木 & 大木, 1988) など、涙液中には多くのたんぱく質が証明されている。人の涙液に関する研究では、アレルギー反応の検査に涙液が有用である (Sacchetti et al., 2011) といった報告もあり、血液同等の用途が報告されている。

また、馬の涙液を用いた研究では、眼病の検査のための方法としてコルチゾールを測定した報告がある (Monk et al., 2014)。この研究では、採取の方法としてチューブを瞬膜に入れている。さらに穿刺によってコルチゾールを直接投薬し、涙液中と血漿中のコルチゾールが同様に上昇したことを述べている。また、涙液中コルチゾールにはたんぱく質結合および非結合のコルチゾールが確認されている。さらに、老齢馬と若齢馬での涙液中コルチゾール濃度の変化を測定した研究では、下垂体性間質機能障害の有無で涙液の生産に差があることを報告している (Hart et al., 2016)。しかし、

これらの研究は眼病における臨床研究を目的としており、ストレスや行動指標としての研究報告は見受けられない。

本研究では涙液によるコルチゾール測定の見証と涙液の病理目的以外での有用性を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

(1) 使用馬

馬は、東京農業大学農学部バイオセラピーセンター（神奈川県厚木市）で飼育されている4頭（アラブ セン 27歳（A1）、北海道和種 セン 11歳（A2）、アパルーサ 牝 18歳（A3）、シェットランドポニー 牝 16歳（A4））および麻布大学（神奈川県相模原市）で飼育されている3頭（木曾 セン 25歳（B1）、ポニー 牝 20歳（B2）、ポニー 牝 20歳（B3））を用いた（表 1-1）。すべての馬は、獣医師によって健康であることが確認され、十分な馴致を行った上で実験を行った。本研究において馴致に要した回数は1回でほぼ完了し、多くて3回程度だった。馴致の内容は目を掌でなで、瞼を引き下げることを繰り返して行った。また、各工程を受け入れるたびに報酬を与え、条件付けることで馴致を行った。この方法で研究に使用した全ての馬は採取が可能であった。本実験は東京農業大学動物実験委員会の承認のもと行った（承認番号 260029）。

実験は、Preの安静時5分、運動20分、Post安静5分間の計30分を行った。運動は、安静時の心拍（20～40bpm）に対して、3倍の運動強度の心拍120bpm以上になるよう、速歩および駆歩での調馬策運動を20分間行った。

(2) 採血および採涙

採涙および採血は、PreとPostとし、蹄洗場に係留して安静状態での採取を行った。係留中は、馬が足の踏みかえや虫を追い払うことが可能なゆとりをもって係留した。採涙お

よび採血は、馬を馬房から出して 10 分以内に完了するように努めた。採血は採血中に行い、それぞれの採取に伴うタイムラグを減らすよう行った。Post は運動後直ちに係留し採取した。

採取を行った時間は、バイオセラピーセンターでは午前 10 時—11 時の時間帯に、麻布大学では 11 時—12 時の 2 つの時間帯で行った。時間が異なるのは、それぞれの施設によって朝の給餌時間が 1 時間半ほど異なるためである。給餌によるコルチゾール濃度の変化に影響されないよう、麻布大学でのサンプルの採取は時間を遅らせて行った。

血液は頸静脈に穿刺し、18 ゲージの注射針（テルモ株式会社，東京）を用いて 10mL シリンジ（テルモ株式会社，東京）に 5 mL 採取した。採取後すぐに EDTA 入り真空採血管（テルモ株式会社，東京）に移し、冷却遠心機で 4°C，3000 回転，10 分間で血漿を分離した。血漿はエッペンチューブ（BM 機器株式会社，東京）に移し、解析まで -80°C で保存した。

涙液の採取は、グラスファイバーフィルター（ADVANTEC 社，東京）を用いた。グラスファイバーフィルターを 1/8 サイズに切り、シルマー方式により馬の両眼の下瞼および瞬膜に挟み込み涙液を採取した（資料 1-1）。1 回の採取で両眼併せて約 200 μ L 得るため、約 5 分要した。涙液を含んだろ紙は、セントリカット超ミニ膜口径（膜口径 0.45 μ ，倉敷紡績株式会社，岡山）に入れ、4°C，6000 回転，10 分間に設定し分離を行った。得られた涙液はエッペンチューブ（BM 機器株式会社，東京）にて保存した。涙液は、測定まで -80°C にて保存した。

コルチゾールの解析には、EQUINE CORTISOL ELISA TEST KIT（Endocrine Technologies, Inc. U.S.A）を用いた。冷凍保存した血漿を 100 μ L 用いた。涙液のアッセイは 100 μ L 以上の必要量を確保できないことがまれにあったため、デュプリケートを優先するために涙液を 50 μ L 用いて希釈をせずに行った。サンプルの解析は 2 重測定で行い、平均値を用いた。プレートリーダーはマイクロプレートリーダー パワースキャン MX BT-SMATBL（株式会社ベイ・バイオ・イメージング，神奈川）を用いた。血漿サン

プルのイントラアッセイの変動値は 6.0%cv, 涙液のイントラアッセイの変動値は 4.6%cv であった。

(3) 心拍測定

馬の心拍は心拍計ホルターPOLAR RS800 (Polar® Electro Oy, Kempele, Finland) を用いて測定を行った。心拍計を馬の胴胸部に巻き、無口頭絡の顎に受信機を取り付けて心拍数および R-R 間隔を計測した。得られた R-R 間隔から自律神経変動を求めた。変換には、Polar Pro Trainer 5 software (Polar Electro OY, Kempele, Finland) および Kubios HRV (version 2.0, University of Kuopio, Finland) を用いた。高周波域は 0.1~0.5Hz, 低周波域は 0.01~0.1Hz に設定し、外れ値を除いて変換を行った。

実験は日を変え、複数回行った。

(4) 統計解析

得られたデータの解析には、運動前後でのコルチゾール濃度の比較を対応のある t 検定を用いて行い、血漿中コルチゾール濃度と涙液中コルチゾール濃度の関係はスピアマンの順位相関係数検定によって統計処理を行った。心拍数の解析には、外れ値や計測不可能であったデータを除いて運動前と運動中の値を、対応のある t 検定を用いた。

なお、結果は平均と標準偏差あるいは誤差で示した。

3. 結果

本研究により、1 回約 5 分の採取で両眼併せて 200 μ L の涙液の採取が可能であった。また、涙液の分泌が少ない馬は、5 分以上の時間をかけることで必要量の採取が可能であった。

コルチゾールの解析の結果、血漿（ $n=36$, $34.53 \pm 16.98 \text{ ng/ mL}$ ）および涙液（ $n=36$, $17.97 \pm 6.72 \text{ ng/ mL}$ ）からコルチゾールが十分に検出された（表 1-2）。得られた濃度をもとに、スピアマンの相関係数によって検定をした結果、血漿中コルチゾール濃度に対して、涙液中コルチゾール濃度は、有意な正の相関が得られた（ $r_s=0.5$, $P<0.01$ ）（図 1-1）。心拍数の変化は、運動前（ $31.71 \pm 10.73 \text{ bpm}$ ）に対して、運動中（ $150.71 \pm 22.44 \text{ bpm}$ ）が有意に高い結果となり、目的とした運動強度を満たした（図 1-3）。

運動の前後での変化を対応のある t 検によって検定を行った結果、血漿中および涙液中コルチゾールの値に有意な変化は得られなかった（図 1-2）。運動後のコルチゾール濃度において、年齢の違いによる差を求めたが、高齢馬（20 歳以上）のコルチゾール濃度（ $18.55 \pm 5.86 \text{ ng/mL}$ ）に対して壮齢馬（10 歳以上 20 歳未満）のコルチゾール濃度（ $22.42 \pm 2.81 \text{ ng/mL}$ ）との間に統計的に有意な差は得られなかった。また、R-R 間隔から得られた自律神経変動にも、有意な差は得られなかった。

4. 考 察

涙液を希釈せず、血液と同一の工程でアッセイを行った結果、涙液からも同様な結果が得られた。涙液中コルチゾール濃度と血漿中コルチゾール濃度の間に、強い正の相関が得られたことから、涙液によるコルチゾールの測定は可能であると考えられる。この結果は、過去に Monk らによる報告（2014）があった研究と同様であった。

さらに、日内変動や給餌の影響を考慮しても、涙液中コルチゾールと血漿中コルチゾールは十分な相関関係を示していた。運動前後の変化に関して、涙液と血漿ともに有意な変化は得られなかったことから、このレベルの運動では「ストレス」をもたらすほどのものではないことが示唆された。これは、調馬策運動が日ごろからおこなわれている基礎調教であること、騎乗に比べると物理的負荷が少なかったことが影響しているのではないかと推察した。

また運動強度と持続時間により、コルチゾールの増加に違いがあったとの報告 (Freestone et al., 1991) から、騎乗者のいない調馬策運動は、馬にとってストレスの少ない運動であったと考えられる。運動内容による反応の違いとして、騎乗による単なる運動とホースセラピーの活動では、コルチゾール値に有意な違いはなかったという Kaiser らの報告 (2006) もある。ストレスの強度と期間によってはコルチゾールの動態は変化することが予想されている (井澤ら, 2007) ことから、ホースセラピーなどにおいて、コルチゾールを評価することが重要である。また、コルチゾールは年齢による個体差は影響しない (Hart et al., 2016) といった報告もあるが、本研究の結果においても年齢による影響はなかった。

競走馬のトレーニングでは、200bpm まで上昇すると言われており、本研究では安静時 (20~40bpm) の約 3 倍以上である 120~180bpm まで上げるよう統制したが、コルチゾールへの反応を促すほどではなかった。また、負荷を与える時間との関係に関して、運動開始 5 分がピークになり 15 分にかけて有意に高い結果となる (Schmidt et al., 2010) という報告もあるが、本研究での運動負荷 (時間 20 分) では、馬に対してコルチゾールの上昇をもたらすほどではなかった。

しかし、本研究の最大の目的である血漿中コルチゾール濃度と涙液中コルチゾール濃度の変化では、双方とも運動前後での統計的有意差はなかったことから、涙液中のコルチゾール濃度の変化は、血漿中コルチゾール濃度との関係性が十分にあると考えられる。

現在、馬の涙液を用いた評価には病理目的のものがほとんどであり、ホースセラピーや障害者乗馬に使われる馬の生理的な指標には、血液や尿に頼るものがほとんどである。しかし、尿や唾液によって行う評価には、様々な留意点がある。尿の場合は、クレアチニンによる補正が必要となることや、細かな採取が困難なこと、採取までに時間がかかることが課題となっている。唾液中と血液中の関係性を調べた研究においては、密接な関係があることを述べた研究 (Schmidt et al., 2010) と、個体によって正の相関が得られなかった研究 (Pell & McGreevy, 1999) の双方が存在している。このように、馬においてコルチ

ゾール測定に唾液を用いることは有用だとは認められているものの、依然として課題は存在している。糞を用いた場合は、腸内通過時間によるタイムラグが1日程度あることが確認されている (Schmidt et al., 2010)。これらのことから、即時的な評価を行いたい研究にはこれらのサンプルは課題が多い。

一方で本研究の涙液を用いたコルチゾールの測定では、血漿中コルチゾール濃度との変化には時間差はほぼなく、さらに十分な関係性があった。また涙液は尿や糞よりリアルタイムな測定が可能であったことが Monk ら (2014) によって報告されている。

これらのことから、ストレスの評価を目的としたバイオマーカーとしての涙液は有用であるといえる。脛にろ紙を挟むシルマー法による採涙は、比較的容易であること、50 μ L でアッセイが十分に行えたこと、原液のまま検出できたことなど、今後の応用において、有用な成果が得られたといえる。非侵襲的に採取できる涙液を用いることで、今後セラピーホースや障害者乗馬の健康評価やストレス評価が可能であり、その必要性が高まることが期待される。

馬のこれまでの健康管理は、「血液」の採取が不可欠であった。十分に馴致すれば、馬の採血は比較的容易であるが、一日に何回も採血すると、ほとんどの馬が明らかな忌避行動を示す。しかし、涙液の採取であれば、短時間に数回採取しても、忌避行動を示すことはほとんどない。本研究において馴致に要した回数は1回でほぼ完了し、多くて3回程度だった。馴致の内容は目を掌でなで、脛を引き下げることを繰り返した。また、各工程を受け入れるたびに報酬を与え、条件付けることで馴致を行った。この方法で研究に使用した全ての馬は採取が可能であった。

これらのことから、様々な生理的パラメータの測定に涙液は有用であると考えられる。さらに、涙液は常に少量ずつ分泌されており、瞬目のたびに新しい涙液が分泌されるため、唾液や尿といったサンプルと比しても採取が簡易であり信頼性も高いと考えられる。

今後は、カテコールアミンやオキシトシンなどの神経伝達物質およびコルチゾール以外のホルモンなどの測定が涙液で可能か検証することが求められる。

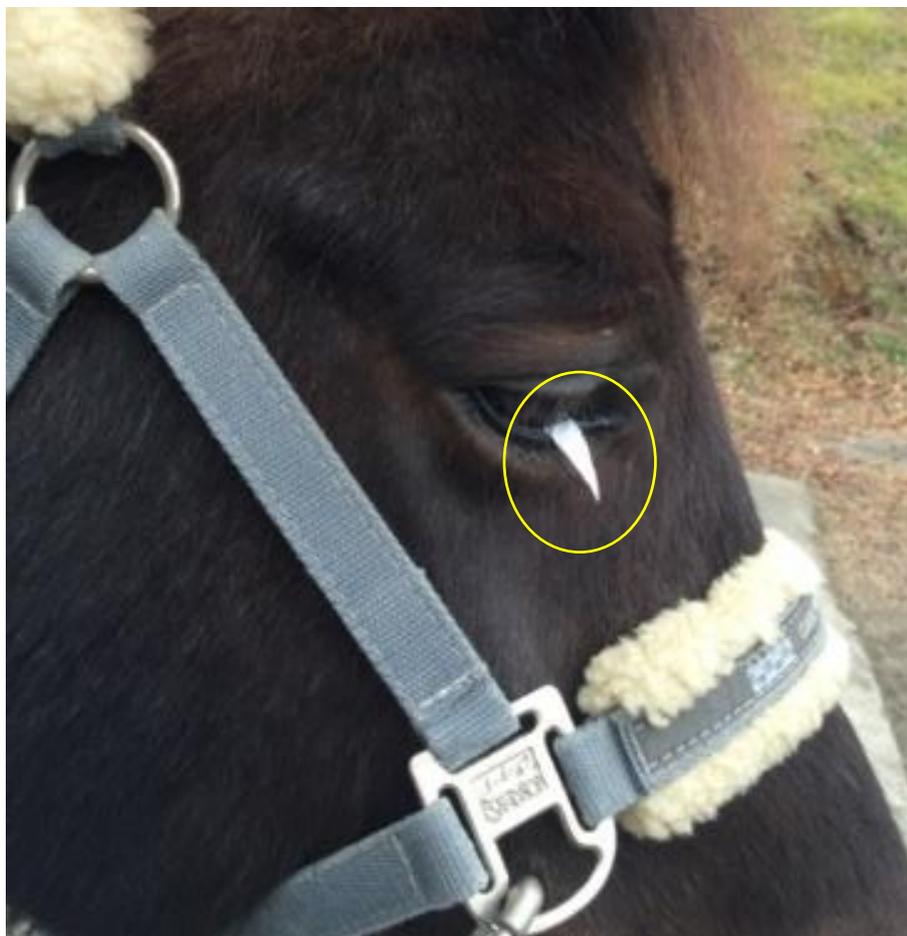
馬と同様に他の動物での応用性もある。野生のアザラシから涙液・唾液・血液を採取し、コルチゾールの検出を行った結果、血清と涙液に相関が得られた (Gundlach et al., 2014) との報告もある。馬と同じような大型家畜には牛や豚といった動物が一般的に挙げられる。かねてより牛は季節により採餌量や乳量に変化をきたすが、これは気温の変化に伴うものとされている (吉岡ら, 2001)。気温や飼育状況のストレス評価には、糞や血液、乳牛の場合は乳汁から生理的測定を行っている。豚の場合、輸送ストレスの評価に呼吸数や体温の他にも採血によって評価しているものもある (松本ら, 2012)。また、飼料と酸化ストレスの評価に関して、血清を用いて評価している論文も見受けられる (Rose et al., 1980)。しかし、乳牛の場合、生理的指標を乳汁から評価できるが、乾乳牛や肉牛といった場合、血液や尿、唾液に頼らざるを得ない。さらに豚は肉資源としての利用が主であり、血液に頼る研究がほとんどである。したがって非侵襲でとれるサンプルは牛同様、尿や唾液によって評価することになる。しかし、これらのサンプルの場合、前述したように採取方法や処理に様々な課題を抱える。また、アザラシのような野生動物の生態調査においても、感染リスクのある血液に頼らず、涙液を用いることで、より安全にかつ非侵襲にサンプルの採取が可能になると考える。

5. 小 括

本研究は、馬の生理的指標の新たなサンプルとして涙液の有用性を示し、さらにストレス評価としての十分な有用性も新たに示した。血漿中と涙液中のコルチゾール濃度の変化が相関関係を示したことから、涙液中のコルチゾール濃度の信頼性は高い。これらにより、馬の生理的パラメータに関して、より非侵襲的な採取を行うことは馬への負担を減らすことにより、正確な評価が可能となる。また、コルチゾール以外の液性物質の検証も可能であることから、新たな研究成果を生み出すことが期待される。

なお、本章においてのみコルチゾールの単位は ng/mL とした (瀧上ら, 2018)。

6. 図表等



資料 1-1 シルマー法による涙液の採取方法

馬の下瞼に挟み、湿潤するまでの状態。丸で囲んだ中央の白いものがろ紙である。

表 1-1 使用馬の品種・性別・年齢・飼育場所

	品種	性別	年齢	飼育施設
A1	アラブ	セン	26	東京農業大学
A2	北海道和種	セン	13	バイオセラピーセンター
A3	アパルーサ	牝	17	
A4	シェットランドポニー	牝	16	
B1	木曾	セン	24	麻布大学
B2	ポニー	牝	19	介在動物学研究室
B3	ポニー	牝	19	

表 1-2 血漿および涙液のコルチゾールの濃度

コルチゾール濃度	血漿 (ng/mL)	涙液 (ng/mL)
n	36	36
Min	6.36	2.79
Max	51.38	26.39
Mean (±SD)	34.53 (±16.98)	17.97 (±6.72)

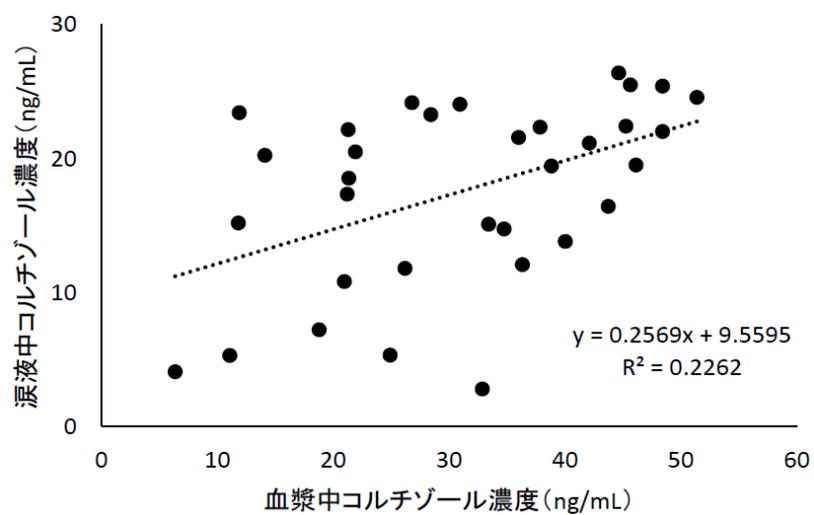
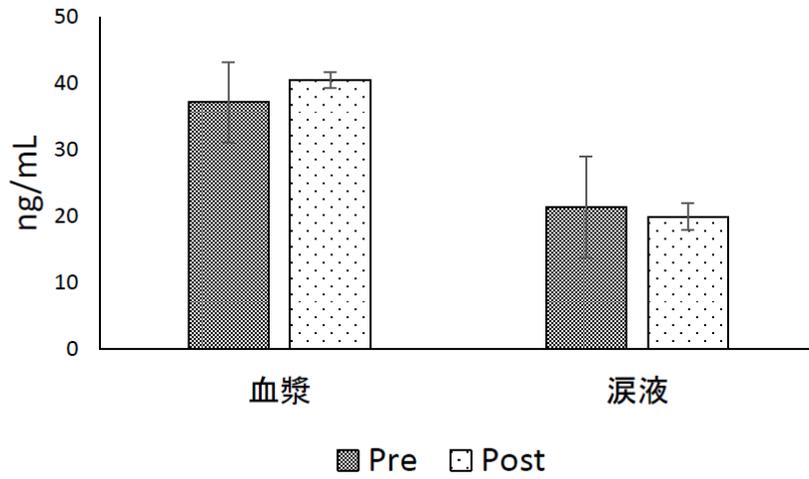


図 1-1 血漿中コルチゾール濃度と涙液中コルチゾール濃度の相関

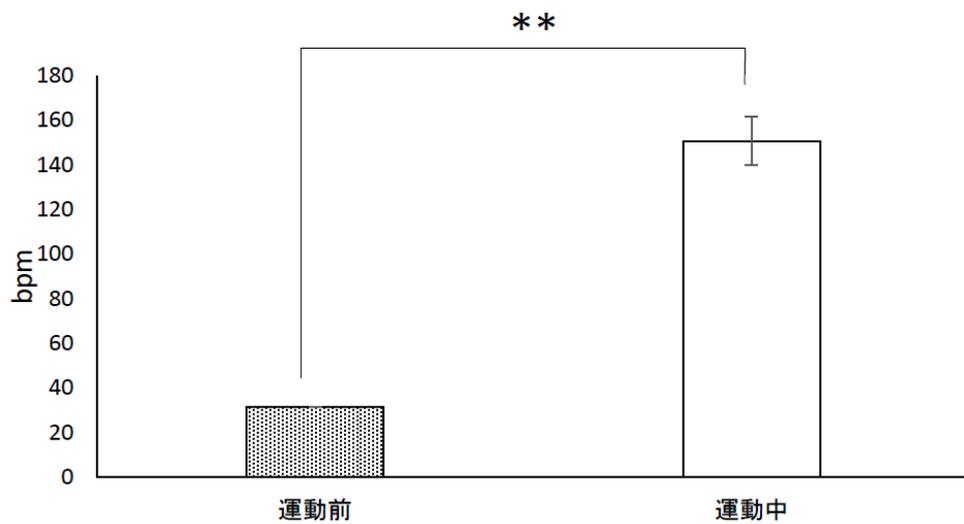
血漿中コルチゾール濃度に対して，涙液中コルチゾール濃度は，有意な正の相関が得られた ($r_s=0.5$, $P<0.01$)。

図 1-2 運動前後での血漿中および涙液中コルチゾールの変化 (ng/mL (Mean±SE))



血漿中および涙液中コルチゾールの値に有意な変化は得られなかった。

図 1-3 運動前後の心拍数の変化



対応のある t 検定による運動前 (31.71bpm ± 10.73) に比べ、運動中 (150.71 ± 22.44bpm) は有意に高い結果となった (mean ± SD, ** $P < 0.01$)。

第2章 涙液を用いた神経伝達物質の測定

1. 序論

ストレス指標としては、コルチゾールの他にもテストステロンなどのホルモン、アドレナリンやノルアドレナリンといったカテコールアミンがある (Halter et al., 1977 ; Sothmann et al., 1991)。また、これにセロトニンを含めたモノアミンも感情や行動において重要な物質であると言われている (Gamero et al., 2003)。これらの測定は動物の生理状態を評価するうえで重要である。

アドレナリンは、組織を支配する神経節前交感神経の活性時に主に副腎髄質からも放出される。この活性は、ストレス下 (例えば、運動、心不全、出血、感情的ストレスまたは興奮、痛み) において起こる。ノルアドレナリンは、副腎髄質からも放出される (カテコールアミンの総放出量の約 20% がノルアドレナリンである) が、循環するノルアドレナリンの主要な供給源は、血管などを支配する交感神経からのスピルオーバーである。通常、交感神経によって放出されるノルアドレナリンの大部分は速やかに代謝されるが、神経によっても吸収され、戻される。しかし、少量のノルアドレナリンは常に血液中に拡散し、体内を循環する。交感神経の高い活性時に、血液中に放出されるノルアドレナリン量は劇的に増加する。

馬における運動前後での生理的变化に関してこれまでにいくつかの研究が行われている。トレッドミルでの運動強度を血中の乳酸値と β -エンドルフィンの関係から評価したものがあ (Mehl et al., 2000) が、個体差が大きいことで押しなべて評価することは難しいとも述べている。

馬における神経伝達物質の測定は、運動強度や疾患による生理的变化の測定に用いられているが、成体サンプルとして血液に頼ることが多く、採取には痛みが伴う。一方で非侵襲に採取できるサンプルには、それぞれの課題がある。唾液には採取前の水分摂取の規制

に気を付けなければならない。動物種によっては口腔内環境によっては処理過程が複雑になる。特に馬の場合、餌のカスや床材、砂などといった不純物を取り除く作業に手間がかかる。尿や糞においては、補正が必要になることや消化器官内の通過時間を考慮する必要があり、即時的な評価を行うことが難しい。しかし、涙液サンプルを用いることで、これらの測定が可能であると考えた。

オブジェクトテストに挑戦した馬の研究では、心拍数（HR）は馬の気質の尺度として使用できるとされ、HRの計測は馬を評価する一つのツールになりえるかもしれない（Visser et al., 2002）。この研究では、騎乗者と馬の追従性やマッチングの度合いが重要になると考えており、馬と騎乗者のパートナーシップがより適合していれば、馬自身が感じるストレスが多い環境においても、より良い対処ができると述べている。

さらに馬は、人間の欲求を察するような行動を示したり、予期したりする驚くべき能力を持っている。馬たちの騎乗者が馬に伝える前に駆歩になることもあるという。馬たちは騎乗者がジャンプを考えているときに視野外のもの（目に見えないもの）や匂い、聞こえてくるものに対して騎乗者へ先に警告する。このような能力は馬が敏感である結果であるが、この特性（感受性）を調べることは容易ではない。

セロトニンと感情の研究は人において多くあり、感情のコントロールに対するセロトニンの分泌が重要な役割をもたらすことが報告されている（Crockett et al., 2010）また、セロトニンは血漿中に多く存在することも分かっている（Stahl et al., 1983）。また、アカゲザルを用いた研究では、セロトニンの分泌と適応性には観連があることが報告されている（Kalin et al., 2003）。これらのことから、セロトニンの測定は馬の生理的状態をとらえるうえで重要であり、感受性など情動の評価が可能であると考えられる。

こうした馬の特性を明らかにするために、コルチゾールの他にノルアドレナリン、アドレナリン、ドーパミンおよびセロトニンなどの生理指標を測定することは特に重要である。血中セロトニンは血小板と結合しており、プラズマ中のセロトニンを正しく測定する

ことは難しい。また血中カテコールアミンの抽出に用いたアルミナにも吸着しない。もし涙液（原液）で測定可能であれば画期的であると考えた。

本研究では、涙液を用いて神経伝達物質の測定が可能であるかを検討し、さらに血液との相関を調べ、涙液の有用性を明らかにした。

2. 方法

(1) 使用馬

実験に用いた馬は東京農業大学農学部バイオセラピーセンター（神奈川県厚木市）で飼育されている4頭（アラブ セン 27歳（A1）、北海道和種 セン 11歳（A2）、アパルーサ 牝 18歳（A3）、シェットランドポニー 牝 16歳（A4））、麻布大学（神奈川県相模原市）で飼育されている3頭（木曾 セン 25歳（B1）、ポニー 牝 20歳（B2）、ポニー 牝 20歳（B3））、障がい者のための馬事普及協会（ピルエット）（栃木県宇都宮市）で飼育されている4頭（サラブレッド セン 20歳（E1）、アラブ セン 21歳（E2）、北海道和種 セン 14歳（E3）、ハフリンガー セン 19歳（E4））を用いた（表 2-1）。これらの馬は、健康に問題がないことを獣医師によって確認された。本実験は東京農業大学動物実験委員会の承認のもと、行った（承認番号 280140）。

(2) 採血および採涙

採涙および採血は、第1章と同様に Pre と Post の安静時に行い、蹄洗場に係留して行った。採涙および採血は、馬を馬房から出して10分以内に完了するように努めた。採血は採涙中に行い、それぞれの採取に伴うタイムラグを減らすよう行った。Post は運動後直ちに係留し採取した。運動は通常行っている調教および障害者乗馬とした。

血液は頸静脈に穿刺し、18ゲージの注射針（テルモ株式会社，東京）を用いて10mL シリンジ（テルモ株式会社，東京）に5 mL採取した。採取後すぐに EDTA 入り真空採血

管（テルモ株式会社，東京）に移し，冷却遠心機で 4℃，3000 回転，10 分間で血漿を分離した。血漿はエッペンチューブ（BM 機器株式会社，東京）に移し，解析まで-80℃で保存した。得られた血漿は，200 μ L を活性アルミナに吸着させてカテコールアミンを抽出した。抽出処理が完了したサンプルは-80℃で保存した。

涙液の採取は，グラスファイバーフィルター（ADVANTEC 社，東京）を用いた。グラスファイバーフィルターを 1/8 サイズに切り，シルマー方式により馬の両眼の下瞼および瞬膜に挟み込み涙液を採取した。1 回の採取で両眼併せて約 200 μ L 得るため，約 5 分要した。涙液を含んだろ紙は，セントリカット超ミニ膜口径（膜口径 0.45 μ ，倉敷紡績株式会社，岡山）に入れ，4℃，6000 回転，10 分間に設定し分離を行った。その後，除タンパク処理を行うためにセントリカット超ミニ（膜口径 0.2 μ ，倉敷紡績株式会社，岡山）を用いて 4℃，6000 回転，10 分間に設定し除タンパク処理を行った。カテコールアミンの測定において，除タンパクを行った涙液は血漿と同様にアルミナ抽出を行った。

一方，セロトニンはアルミナに吸着しないため，モノアミンの測定は，膜口径 0.02 のフィルターを用いて除タンパク処理を行った涙液 70 μ L をバイアルチューブに分注し，0.5mol/L 酢酸を 20 μ L 添加し酵素反応を止めた。さらに内部標準としてイソプロテノール塩酸 10pg/mL を 10 μ L 添加し混合した。

涙液と血漿の前処理は採取したその日に行った。前処理を行ったサンプルは解析まで-80℃にて冷凍保存した。

カテコールアミンおよびモノアミンの測定には，高速液体クロマトグラフィー（EiCOM，京都）を用いて行った。カテコールアミンの測定は検出カラム EICOMPAK CA-50DS（2.1mm，id.×150mm）を用いた。プレカラムは CA-ODS（3.0mm，id.×4mm）を用いた。設定温度は 25℃とし，加電圧は 450mA，移動相条件は 700mg/L1-オクタスルホン酸ナトリウムおよび 50mg/L とし，メタノールは 12%とした。解析時間は流速 230 μ L/min において 30 分，100 μ L/min においては 90 分とした。

セロトニンの測定には EICOMPAK SC-50DS (φ 3.0mm, id. ×150mm) を、プレカラムは PREPAK (φ 3.0mm×4mm) を用いた。設定温度は 25℃とし、加電圧は 750mA、移動相は 0.1M 酢酸-クエン酸バッファーとし、メタノールは 17%とした。解析時間は流速 500 μ L/min で 30 分とした。

(3) 心拍測定

馬の心拍は心拍計ホルター-POLAR RS800 (Polar® Electro Öy, Kempele, Finland) を用いて測定を行った。心拍計を馬の胴胸部に巻き、無口頭絡の顎に受信機を取り付けて心拍数および R-R 間隔を計測した。得られた R-R 間隔から自律神経変動を求めた。変換には、Polar Pro Trainer 5 software (Polar Electro OY, Kempele, Finland) および Kubios HRV (version 2.0, University of Kuopio, Finland) を用いた。高周波域は 0.1～0.5Hz, 低周波域は 0.01～0.1Hz に設定し、外れ値を除いて変換を行った。

(4) 統計方法

血漿中および涙液中のアドレナリン, ノルアドレナリン, ドーパミンを活動前後においてスピアマンの順位相関係数を用いて統計を行った。また, アドレナリン, ノルアドレナリン, ドーパミンの活動前後の濃度をそれぞれ対応のある t 検定を用いて行った。

また, 飼育場所での比較を行うため, ノルアドレナリン, アドレナリン, ドーパミンの前後の値から変化量を求めて A1～B3 の馬群と E1～E4 の馬群をウェルチの t 検定を用いて比較した。

心拍変動解析により得られた LF/HF 値と, ノルアドレナリンの変化量を, スピアマンの順位相関係数によって検定を行った。

検出されたセロトニンは運動前後での比較を対応のある t 検定を用いて行った。

3. 結 果

アルミナによって処理した涙液サンプルは、血漿サンプルと同様に検出が可能であった (図 2-1)。

血漿中カテコールアミンの濃度の平均 (\pm SD) は、ノルアドレナリン 451.36 (\pm 203.88) pg/mL, アドレナリン 187.37 (\pm 291.32) pg/mL, ドーパミン 351.37 (\pm 124.11 pg/mL) であった。抽出した涙液中の濃度の平均 (\pm SD) はそれぞれ、ノルアドレナリン 93.87 (\pm 174.56) pg/mL, アドレナリン 162.47 (\pm 399.62) pg/mL, ドーパミン 357.36 (\pm 156.67) pg/mL であった。

スピアマンの順位相関係数を用いて、涙液中の濃度と血漿中濃度の関係を求めた結果、ノルアドレナリン、アドレナリン、ドーパミンの全てにおいて相関が得られた (表 2-3)。ノルアドレナリンの相関係数は 0.4 ($P < 0.01$) (図 2-2), アドレナリンの相関係数は 0.6 ($P < 0.01$) (図 2-3), ドーパミンの相関係数は 0.4 ($P < 0.01$) (図 2-4) であった。運動前後での比較では、血液中と涙液中のカテコールアミン濃度では有意な上昇は見られなかった。また、ノルアドレナリン、アドレナリン、ドーパミンの前後の値から変化量を求めて大学で飼育している A1~B3 の馬と、障害者乗馬施設で飼育されている馬の E1~E4 の馬とを比較した結果、飼育環境や飼育状況による統計的な差は得られなかった (表 2-3)。

セロトニンの解析の結果、検出された平均濃度 (\pm SD) は 2.11 (\pm 0.14) ng/mL であった。運動前後間の比較において、統計的な有意差は得られなかった (表 2-4)。

R-R 間隔から求めた LF/HF に対して、涙液中ノルアドレナリンの変化量をスピアマンの順位相関係数によって検定を行った結果、有意な正の相関が得られた ($r_s=0.7$, $P < 0.01$) (図 2-6)。

4. 考 察

カテコールアミンの血漿中濃度と涙液中濃度の強い相関は、涙液による生理的変化を評価するうえで有用であり、生理的指標として十分に信頼できると考えられる。また涙液による神経伝達物質の測定は本研究が世界的にも初めてであり、非侵襲的かつ即時的な評価が可能となったことは大きな成果であった。涙液によりアドレナリンの評価が可能になったことは、コルチゾールに比べ、より詳細なストレス評価が可能であることを示唆する。コルチゾール濃度の場合、ネガティブフィードバックにより時間経過とともに減少し、サンプリングの影響を強く受けることからストレスレベルを正しく評価することは簡単ではない。しかし、アドレナリンを用いたストレス評価を行うことで、より正確なストレス評価が可能であると考えられる。ラットの反復固定ストレスに対する尿中のカテコールアミンの測定を行った研究 (Kvetňanský et al., 1970) では、繰り返し刺激を提示することでストレス反応が減るといった報告がある。このことから、本研究において馬のカテコールアミンの濃度に変化がなかったことは、馬は十分に慣れた、あるいは理解している活動ならびに運動だったためと考えられる。さらに、大学で飼育している馬 (A1~B3) と、障害者乗馬を常に行っている馬 (E1~E2) のカテコールアミンの変化量を比較しても、統計的な有意差はなかったことから、馬自身が普段から「日常」と思って活動や調教を受けていたと考えられる。

また、LF/HF に対して、涙液中のノルアドレナリンは正の相関を示した。このことは、馬の涙液中ノルアドレナリンと LF/HF 値は交感神経活性を正しく評価するものと考えた。急性心理ストレスによって LF/HF 値とノルアドレナリンの有意な上昇がみられた報告 (Laskar et al., 2004) もあることから、ノルアドレナリンの評価を行うことで、コルチゾールの変化ではとらえきれない生理的変化をとらえ、馬自身の生理状態を評価できると考えられる。Laskar らの研究 (2004) では、尿中のカテコールアミンを評価しているが、本研究の涙液中のノルアドレナリンと LF/HF 値の変動も同様の变化であった。

馬のカテコールアミンとストレスの関係について、トレッドミルでの運動中に血中のアドレナリン、ノルアドレナリン、コルチゾールが有意に上昇したとの報告 (Kurosawa et

al., 2001) がある。他にも馬のストレスとコルチゾールの関係に関して、単離ストレスを与えた時の変化を測定した研究 (Wilson et al., 1988) がある。この研究では、コルチゾールの変化はなかったものの、血漿中のカテコールアミンの濃度は上昇していた。

犬におけるカテコールアミンの変化に関して、堀井ら (2003) は高齢者入居施設での介在活動に犬が普段生活している落ち着いた状態に比べてカテコールアミンは有意に上昇していたと報告している。一方で植竹らの研究 (2007) では、犬が飼い主と一緒にいれば、特別養護老人ホームでの活動では環境や雰囲気に対して容易に順応ができると述べている。Piven ら (1991) は人のセロトニンを検出していた。その報告ではコントロール群 (97.7ng/mL) に比べて障碍児 (230.70ng/mL) は有意に高かったことを報告している。しかし、Platelet-rich plasma を用いた比較であり、涙液を用いた報告はない。

さらに、本研究では、セロトニンの検出 (平均 2.11ng/mL) が可能であった。セロトニンの分泌について、馬の母子分離の方法によって分泌量が変わったとの報告 (Bruschetta et al., 201) がある。この研究では、母子の分離が完全分離の方が部分的な分離よりも馬にとって効果が高いことをセロトニンレベルの違いで述べている。

しかし、本研究ではセロトニンの値には幅があり、A 群のすべての値を平均すると統計的な有意差は得られなかった。多様な刺激を入れることの多い障碍者乗馬や馬介在活動といった活動では、セロトニンの分泌に変化をもたらすほどではなかったと推察される。しかし、個体ごとで運動前後を比較すると、A2 は運動前後において統計的に有意な減少を示した。これは、運動による影響ではなく、馬自身の状態によってセロトニンの値に影響を与えているのではないかと推察した。セロトニンの減少は、一般的にストレス下の状況であると言われている。しかし、セロトニンの分泌は運動によって刺激されることが分かっている。人において昇降運動といった単純な運動を行うことで運動後にセロトニン濃度が上昇したといった報告 (筒井, 2007) がある。このことから、疲労感を感じている馬や使用頻度が高くなった馬の中でも特にセロトニンが下がっている馬に対して、単純なトレ

ーニングを再び行うことでセロトニンの分泌を促し、馬の精神的な健康を取り戻すことができると考えられる。

犬と人との相互関係に関して、セロトニンの分泌が関与している可能性があることが報告されている。シェルターに長期滞在する犬は、人との相互関係が低く、セロトニンの分泌も低かったことが報告 (Alberghina et al., 2017) されている。また、犬のトレーニングにおいて加藤らの研究では、行動修正療法後の血漿中セロトニン濃度は行動修正療法前に比べて有意な減少を示した (加藤, 2012)。加藤は、犬はトレーニングによってセロトニン濃度が減少し、ストレスが緩和され、正常レベルに戻ったことで、攻撃が緩和されたと述べている。これらのことから、セロトニンの分泌は馬のトレーニングや疲労度を測るために有用な指標であると考えられる。

しかし、セロトニンの意義を語るためには正確にセロトニンレベルを把握しなければならない。

本研究の涙液を用いることにより HPLC で測定できることを明らかにしたことは、きわめて意義深い。

5. 小 括

第 2 章の実験によって、涙液を用いた神経伝達物質の測定が可能となった。この成果は馬の研究において世界的にも初めての成果であり、涙液は血液と同様の信頼性がある。また、涙液中ノルアドレナリンの濃度と LF/HF 値には強い正の相関が得られ、生理的変化指標として涙液の有用性は高いものと考えられる。

また、飼育環境や使用方法が違う馬でも、運動や活動の前後の値に統計的な差はなかった。このことから、馬は「日常」を理解し、普段の活動では大きなストレスを感じていないことが明らかとなった。

さらに希釈を行っただけの涙液によって、セロトニンの検出が可能であったことから、こ

れまでのセロトニンの測定に比べ、より簡単に評価が可能であり、馬と人との関係においても、より客観的な測定が可能であると考えられる。

6. 図表等

表 2—1 使用馬の品種・性別・年齢・飼育場所

	品種	性別	年齢	飼育施設
A1	アラブ	セン	26	東京農業大学
A2	北海道和種	セン	13	バイオセラピーセンター
A3	アパルーサ	牝	17	
A4	シェットランドポニー	牝	16	
B1	木曾	セン	24	麻布大学
B2	ポニー	牝	19	介在動物学研究室
B3	ポニー	牝	19	
E1	サラブレッド	セン	20	非特定営利法人
E2	アラブ	セン	21	障害者のための馬事普及協会
E3	北海道和種	セン	14	
E4	ハフリンガー	セン	19	

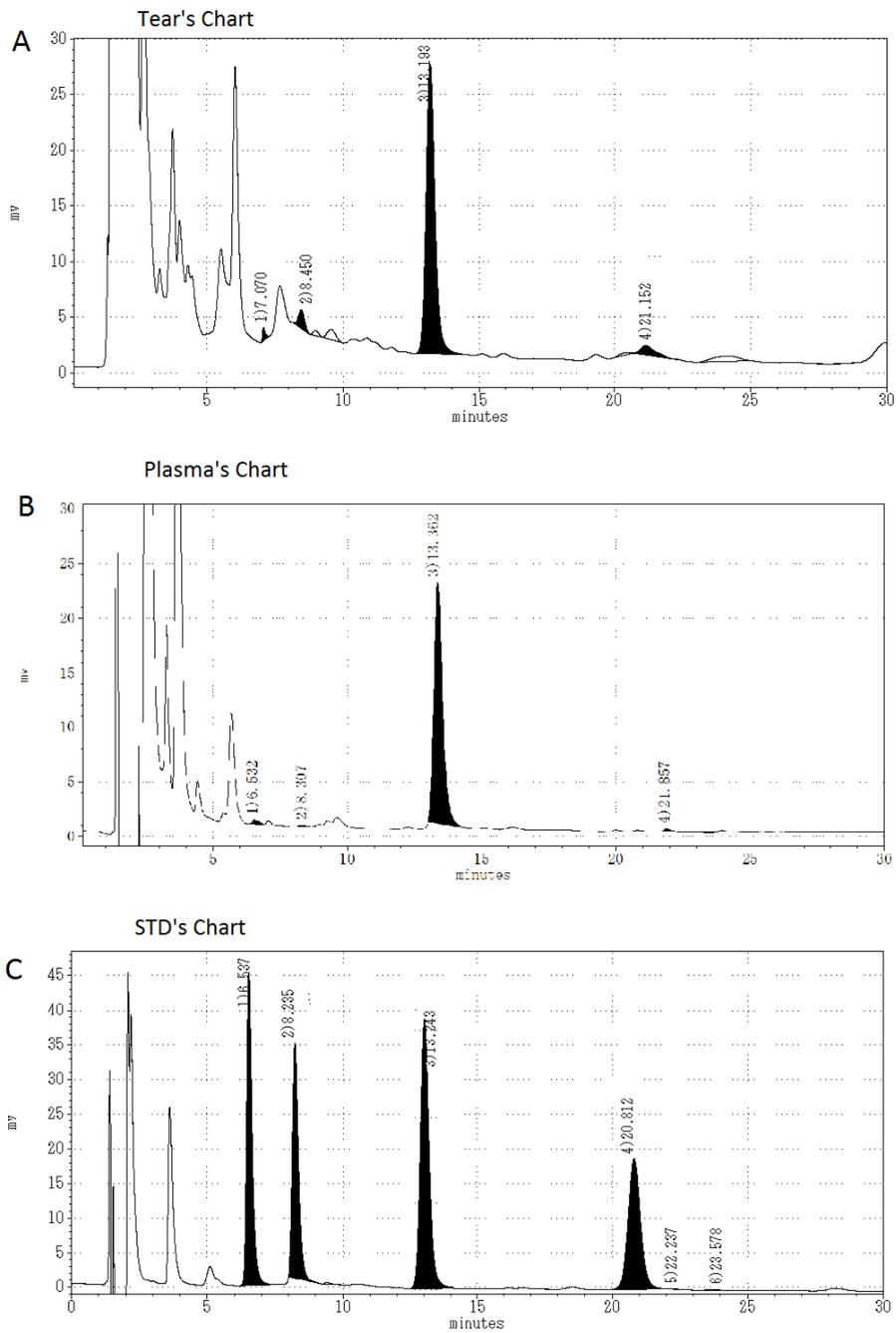


図 2-1 HPLC による涙液 (A), 血漿 (B), スタンダード (C) のクロマトグラム

1) はノルアドレナリン, 2) はアドレナリン, 3) は 3,4-ジヒドロキシベンゼンアミン, 4) はドーパミンの検出によるピークを示す。

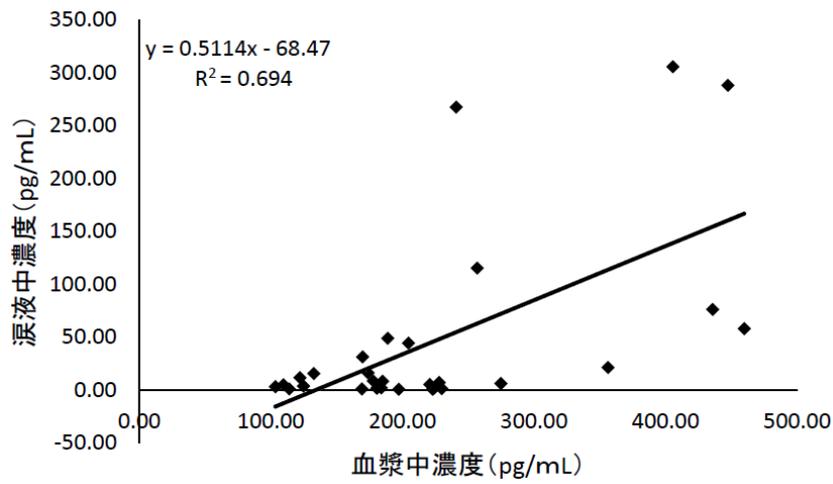


図 2-3 血液中および涙液のノルアドレナリン濃度の関係

スピアマンの順位相関係数を用いて、涙液中の濃度と血漿中濃度の関係を求めた結果、十分な相関が得られた($r_s=0.4$, $P<0.01$)。

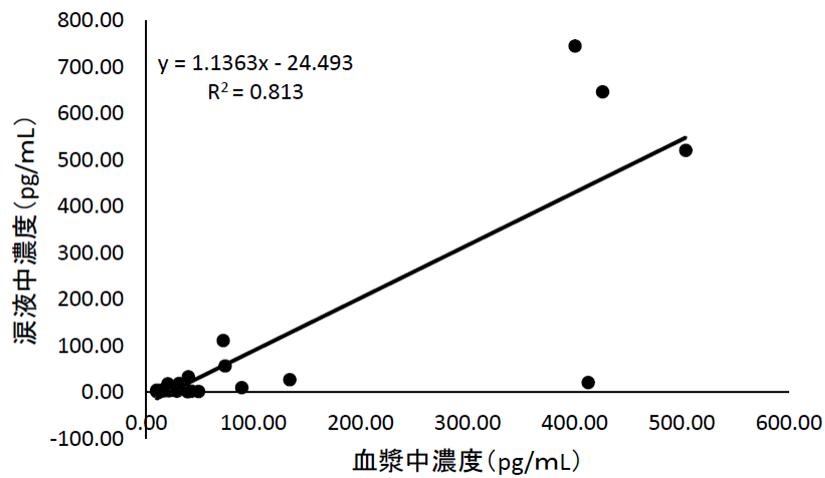


図 2-4 血漿中および涙液中のアドレナリン濃度の関係

スピアマンの順位相関係数を用いて、涙液中の濃度と血漿中濃度の関係を求めた結果、十分な相関が得られた ($r_s = 0.6$, $P < 0.01$)。

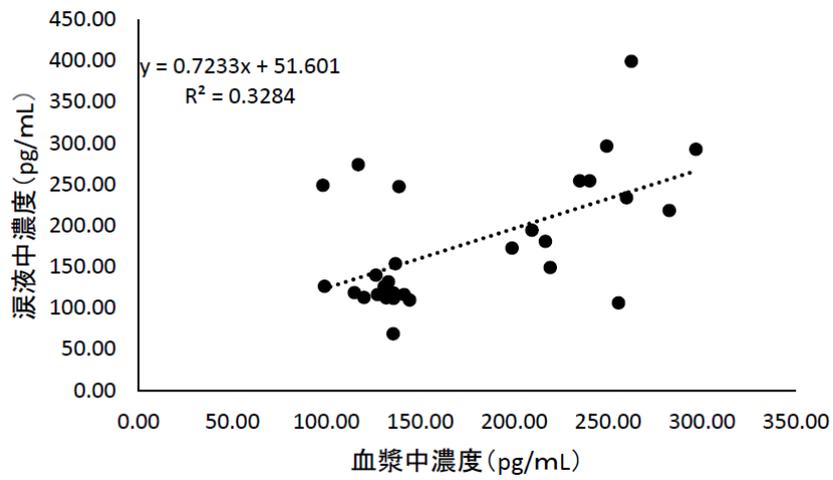


図 2-5 血漿中および涙液中のドーパミン濃度の関係

スピアマンの順位相関係数を用いて、涙液中の濃度と血漿中濃度の関係を求めた結果、十分な相関が得られた($r_s=0.4$ ($P<0.01$))。

表 2-2 涙液中および血漿中カテコールアミンの解析結果とスピアマンの順位相関係数検定の結果

n=29	血漿 (±SD)	涙液 (±SD)	rs	P値
ノルアドレナリン	451.4 (±203.9)	93.9 (±174.6)	0.4	** -0.01
アドレナリン	187.4 (±291.3)	162.5 (±399.6)	0.6	** -0.01
ドーパミン	351.4 (±124.1)	357.4 (±156.7)	0.4	** -0.01

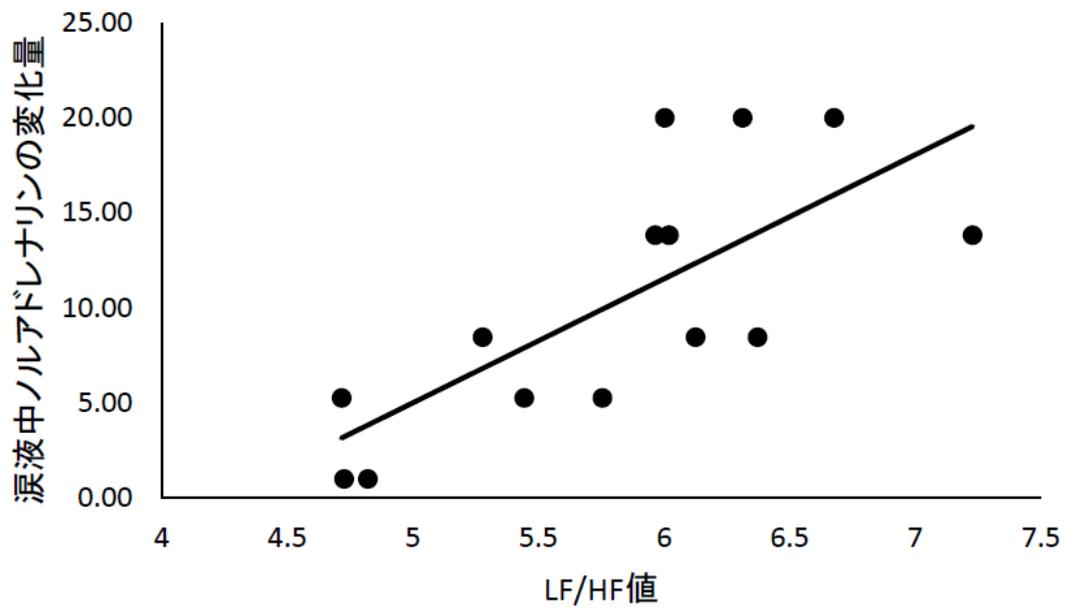


図 2-6 LF/HF 値と涙液中ノルアドレナリンの変化量の関係

スピアマンの順位相関検定の結果，有意な正の相関が得られた ($r_s=0.7$, $P<0.01$)。

表 2-3 飼育場所の違いによるカテコールアミンの比較

	大学	障害者乗馬施設
	Mean ± SD	Mean ± SD
ノルアドレナリン	-7.09 ± 25.19	-93.44 ± 310.78
アドレナリン	-1.80 ± 16.12	-8.00 ± 230.04
ドーパミン	11.62 ± 44.35	-94.63 ± 406.16

ウェルチのt検定

表 2-3 セロトニンの検出結果と運動前後での値

	n	(ng/mL)			
		Pre		Post	
		Mean ±	SD	Mean ±	SD
A1,A2,A3,A4	23	2.74 ±	0.98	2.3 ±	1.76
A1	6	3.21 ±	0.82	4.24 ±	0.59
A2	6	2.62 ±	0.63	1.71 ±	0.35*
A3	6	2.06 ±	0.85	0.81 ±	0.65
A4	4	1.6 ±	1.09	0.47 ±	0.41

対応のあるt検定 * $P < 0.01$

第3章馬の涙液を用いたオキシトシンの測定とドーパミン、コルチゾールとの関係

1. 序論

第1章と第2章の研究から、涙液の有用性が明らかになったことと、涙液による更なる生理的評価を行うために、さらにオキシトシンに焦点をあてた。また、インストラクターや飼育者の主観的気質評価と、生理的反応に関係性があるのか、評価を行った。

オキシトシンは母子関係や他者への思いやり、ストレス緩和などと関係があるとされている。オキシトシンの発見は、1906年にイギリスのヘンリーデールが下垂体ホルモンとして発見したことが始まりであり、その後その多様な役割が多くの研究により明らかとなった。動物におけるオキシトシンの研究には、繁殖において様々な動物の発情や出産

(Dwyer et al., 2004; Finkenwirth et al., 2016)、母乳に影響をおよぼした (Negrão et al., 2006) など報告などがある。

オキシトシンは自閉症スペクトラム障害に対する脳機能活性の効果や社会的な行動に関係があると言われており、近年では点鼻薬としての利用もされ (Guastella et al., 2010) ている。

2009年、Nagasawaらによって人とペットの関係において、飼い主と犬との関係にオキシトシンが関わることが報告 (2009) された。また、Handlinらの報告 (2011) と併せると、ペットと過ごすことで人とペットのコルチゾールの減少やオキシトシン分泌量の変化が見られたことや、オオカミと人との間では同様の変化がなかったことなど、人と動物のかかわりにはオキシトシンなどの内的な変化があることが判明している。

しかし、人との活動における馬のオキシトシンはまだ明らかにされていない。犬の研究においては、活動前後の変化を尿 (Mitsui et al., 2011) やあるいは唾液 (Spengler et al., 2017) を用いて評価している。また、人間においても生理的評価には唾液の使用がほとんど

どである。これらは非侵襲に採取が可能なサンプルとして多くの研究で行われているが、馬の場合は同様に行うことが難しい。草食動物である馬は、常に何かしらの食べ物を探し採食する行動をする。これは口腔内に床材や飼料が残っていることを意味し、サンプルはとして用いることは難しい。

そこで、3章では、非侵襲に採取ができる涙液からオキシトシンを測定することと、その変化に関する実験を行った。またオキシトシンの他にコルチゾール、ドーパミンなど他の物質も同様に解析を行い、それらの関係を調べた。さらに馬の気質に関してアンケート調査を行い、これらの化学物質との関係を調べた。

2. 方法

(1) 使用馬

実験に用いた馬は東京農業大学農学部バイオセラピーセンター（神奈川県厚木市）で飼育されている4頭（アラブ セン 27歳（A1）、北海道和種 セン 11歳（A2）、アパルーサ 牝 18歳（A3）、シェットランドポニー 牝 16歳（A4））、麻布大学（神奈川県相模原市）で飼育されている3頭（木曾 セン 25歳（B1）、ポニー 牝 20歳（B2）、ポニー 牝 20歳（B3））、帝京科学大学で飼育されている3頭（山梨県上野原市）（日本ポニー種 牝 15歳（C1）、中間種 牝 22歳（C2）、ハフリンガー セン 17歳（C3））、および非営利活動法人EPO（静岡県富士宮市）で飼育されている7頭（ポニー 牝 18歳（D1）、ポニー 牝 21歳（D2）、クォーター 牝 15歳（D3）、ポニー 牝 28歳（D4）、ポニー セン 27歳（D5）、北海道和種 セン 20歳（D6）、ポニー セン 14歳（D7））を用いた（表3-1）。これらの馬は、健康に問題がないことを獣医師によって確認された。本実験は東京農業大学動物実験委員会の承認のもと行った（承認番号280140）。

(2) 採涙

採涙は、第1章と同様に朝の飼いつけ中を含めた活動前としての Pre, 活動や調教を行った後として Post を安静時に採取, 朝は馬房の中で無口頭絡を付けて行い, Pre と Post は蹄洗場に係留して行った。Pre の採涙は, 馬を馬房から蹄洗場に係留した直後から行うよう努めた。Post は運動後直ちに係留し採取した。運動は通常行っている調教および障害者乗馬とした。

涙液の採取は, グラスファイバーフィルター (ADVANTEC 社, 東京) を用いた。グラスファイバーフィルターを 1/8 サイズに切り, シルマー方式により馬の両眼の下瞼および瞬膜に挟み込み涙液を採取した。1 回の採取で両眼併せて約 600 μ L 得るため, 約 15 分要した。涙液を含んだろ紙は, セントリカット超ミニ膜口径 (膜口径 0.45 μ , 倉敷紡績株式会社, 岡山) に入れ, 4 $^{\circ}$ C, 6000 回転, 10 分間に設定し分離を行った。オキシトシン, およびコルチゾールの測定のために必要な 400 μ L はエッペンチューブ (BM 機器株式会社, 東京) に移し, 解析まで-80 $^{\circ}$ Cで保存した。

コルチゾールの測定には EQUINE CORTISOL ELISA TEST KIT (Endocrine Technologies, Inc. U.S.A) を用いた。測定は第1章と同様に行った。

オキシトシンの測定には, Oxytocin Enzyme Immunoassay Kit (ARBOR ASSAYS, Inc. USA) を用いて行った。涙液は抽出をせずに測定を行った。

カテコールアミンの測定のため, 残りの 200 μ L を用いて除タンパク処理を行った。すなわちセントリカット超ミニ (膜口径 0.2 μ , 倉敷紡績株式会社, 岡山) を用いて 4 $^{\circ}$ C, 6000 回転, 10 分間に設定し除タンパク処理を行った。モノアミンの測定において, 除タンパクを行った涙液 70 μ L をバイアルチューブに分注し, 0.5mol/L 酢酸を 20 μ L 添加し酵素反応を止めた。さらに内部標準として 3,4-ジヒドロキシベンゼンアミン 10pg/mL を 10 μ L 添加し混合した。前処理を行った涙液は解析まで-80 $^{\circ}$ Cで保存した。

カテコールアミンの測定に使用した検出カラムは EICOMPAK CA-50DS (2.1mm,id. \times 150mm) であった。プレカラムは CA-ODS (3.0mm,id. \times 4mm) を用いた。設定温度は

25℃とし、加電圧は 450mA、移動相条件は 700mg/L1-オクタスルホン酸ナトリウムおよび 50mg/Lとし、メタノールは 12%とした。解析は流速 100 μ L/min とし、分析時間は 90 分とした。

(3) アンケート

飼育者およびインストラクターによるアンケート調査は各施設で飼育・調教に携わる者に依頼した。アンケートは Momozawa らの研究 (2003) をもとに気質の項目を設定した。項目は「茶目っ気」「好奇心」「友好的」「神経質」「興奮性」「頑固」「愛着」「理解力」とした。これらを 5 点で評価し、「茶目っ気」「好奇心」「友好的」「神経質」「興奮性」は「全く当てはまらない」を 1 点、「とても当てはまる」を 5 点とした。「頑固」は従順を 1 点、頑固を 5 点とした。「愛着」は誰にでも当てはまる場合は 1 点、特定の人場合は 5 点とした。「理解力」は乏しいが 1 点、優れているは 5 点とした。これらの点数を平均化して個体の特徴とした。また、回答者が個体を使う頻度や個体の特徴、活動に選択する際のポイントを自由記述によって回答を求めた (資料 3-1)。得られた回答とオキシトシンおよびコルチゾール、ドーパミンとの関係性を求めた。

(4) 統計処理

オキシトシンやドーパミン、コルチゾールの測定結果は、活動前後の比較を対応のある t 検定を用いて行った。また個体ごとの前後比較においても対応のある t 検定を用いて行った。オキシトシンとドーパミンの関係に関して、オキシトシンとドーパミンそれぞれの前後の値から変化量を求め、スピアマンの順位相関係数を用いて検定を行った。

アンケートの回答結果は、項目間の比較を一元配置分散分析および Tukey-Kramer 法を用いて比較を行った。

3. 結果

オキシトシンの結果、全体の平均濃度 (±SD) は 81.96pg/mL (±68.04 pg/mL) であった。この時のイントラアッセイの変動値は 6.3%cv であった。全体の前後比において、統計的な有意差は得られなかった。個体ごとに前後比を求めた結果、B1 において、Pre (171.7pg/mL) に対して、Post (230.8pg/mL) が有意に高くなった ($P<0.03$)。その他の個体においては統計的な有意差は得られなかった。

コルチゾールの結果、全体の平均濃度 (±SD) は 1.65 (±1.65) μ g/dL であった。この時のイントラアッセイの変動値は 7.7%cv であった。全体の前後比較において、統計的な有意差は得られなかったが、個体別に前後比較を行った結果、B1 が Pre (1.16 μ g/dl) に対して Post (0.87 μ g/dl) が有意に低下した。また、D2 (Pre (1.03 μ g/dl) VS Post (0.35 μ g/dl)) も同様であった。一方、値が高くなった個体もあった。B3 は Pre (3.56 μ g/dl) に比べて Post (4.40 μ g/dl) となった。また A3 (Pre (0.25 μ g/dL) VS Post (0.23 μ g/dL)), B3 (Pre (3.20 μ g/dl) VS Post (4.58 μ g/dl)) は統計的な有意差はなかったものの、同様の傾向を示した。

ドーパミンの結果、平均濃度 (±SD) は 240.43 (±619.74) pg/ μ L であった。全体の前後比較において統計的な有意差は得られなかった。個体ごとに比較を行った結果、B1 (Pre (205.12 μ g/dl) VS Post (67.97 μ g/dl)) と B2 (Pre (108.74 μ g/dl) VS Post (12.61 μ g/dl)), D2 (Pre (1.52 μ g/dl) VS Post (0.60 μ g/dl)) は有意に低下した。また、A3 (Pre (171.58 μ g/dl) VS Post (162.50 μ g/dl)), B3 (Pre (48.09 μ g/dl) VS Post (23.89 μ g/dl)) は統計的な有意差は得られなかったものの値は低下した (表 3-3)。

オキシトシンとドーパミンの値からスピアマンの順位相関係数を用いて検定を行ったところ、高い相関が得られた ($r_s=0.7$, $P<0.01$, 図 3-1)。

D7の個体においては、涙液のすべての解析に必要な量が確保出来なかったため、オキシトシン、ドーパミン、コルチゾールの解析からは除外した。また、他個体の解析において検出限界であったものはEとして表記した。

飼育者やインストラクターによる馬が苦手とする運動を行った時の反応の結果、オキシトシンやドーパミンは減少していた(表3-5)。

アンケートの回答数はA群では3名、B群では1名、C群では2名、D群では4名から回答が得られた。

アンケートの結果から、インストラクターや飼育者による馬の評価を出すために、項目ごとの点数を比較した。全項目の平均は3.0(±0.9)点であった。各項目において「茶目っ気」は3.1(±0.8)点、「好奇心」は3.1(±0.8)点、「友好的」は3.4(±0.5)点、「神経質」は2.7(±1.0)点、「興奮性」は2.5(±0.8)点、「頑固」は3.1(±1.0)点、「愛着」は2.6(±0.9)点、「理解力」は3.7(±0.8)点であった。得られた結果から、各項目で個体を高得点群(4.0~5.0点)とした。「茶目っ気」で高得点群であったのは4頭で、A1, C1, C3, D7であった。「好奇心」で高得点群であった馬は4頭で、A1, A2, C1, D7であった。「友好的」で高得点群であった馬は5頭で、A1, A2, B2, B3であった。「神経質」で高得点群であった馬は3頭で、A3, A4, D3であった。「興奮性」で高得点群であった馬は1頭で、C1であった。「頑固」で高得点群であった馬は4頭で、A3, A4, B1, C1であった。「愛着」で高得点群であった馬は1頭で、A4であった。「理解力」で高得点群であった馬は9頭で、A4, B1, B2, C2, C3, D2, D4, D6, D7であった(表3-4)。

項目間の比較を一元配置分散分析およびTukey-Kramer法を用いて比較を行った。「理解力」に対して「興奮性」と「愛着」が有意に低く($P<0.01$)、次いで「神経質」が有意に低かった($P<0.05$)。その他の項目間での統計的な有意差は得られなかった(図3-2)。これらの項目に対して、年齢との関係性は得られなかった。

自由記述において、「安心」「安定」「使いやすい」「従順」といった評価がついた個体は C2, C3, D1~D6 の 8 頭だった。

4. 考 察

全ての馬の値をもとにオキシトシン，ドーパミン，コルチゾールの濃度の前後比較を行った結果，統計的な有意差は得られなかったが，これは個体差が関連すると推測した。先行研究や介在犬の調査でも全頭の平均値による比較は難しいといった報告が数多くあり，本研究においても同様であったと考えられる。一方で，個体間でのオキシトシンやコルチゾール，ドーパミン濃度の前後比較において，増減には明らかな個体差があることが分かった。これらのことから，人との関係には個体差がある可能性が高い。また，馬が強い運動や苦手なことをインストラクターが要求したときに，オキシトシンやドーパミンは明らかに減少していた。このことから，馬の個別の特性を評価するにはオキシトシンやドーパミン，コルチゾールの測定が特に重要であると思われた。平常値（基礎値）が高い馬と，そうでない馬がいることも明らかとなり，これは馬の素質として重要な指標であると考えられる。特に B1 の馬は，他の研究において乗馬による子供の計算や GO/NO GO 課題を行った際に，子供をリラックス状態にした馬でもあった。さらに，オキシトシンの基礎値が高い馬は D 群の馬に多かった。このことから，オキシトシンの基礎値が高い馬は，子供との相性が高いのではないかと考えられる。

ドーパミンとオキシトシンの関係に関して，統計的に有意な正の相関が得られたことは馬の特性評価に用いることは重要である。これまで馬においてオキシトシンやドーパミンの測定は競技などのストレス指標としての研究や病理目的の研究がほとんどであった。サラブレッドとアラブの血漿中カテコールアミンを測定した結果 (Podolak et al., 2006)，サラブレッドの方がノルアドレナリンとドーパミンが高くなったと報告されている。

しかし、障害者乗馬や馬介在活動といった馬の評価や選択の指標となることはなかった。本研究において、コルチゾールの前後に変化がみられなかったことは、馬において障害者乗馬や馬介在活動はストレスと感じていなかったであろう。

アンケートの結果から、大学で飼育されている A1~C3 までの馬は、「理解力」以外の項目においても、高得点の項目が多かった。一方、障害者乗馬施設で飼育されている D1~D7 の馬においては、理解力以外は D3 が「神経質」、D7 が「茶目っ気」と「好奇心」で高得点であったが、それ以外は 2.0 点~3.75 点代の点数だった。しかし、D 群の馬はオキシトシンの基礎値が高い馬が多かった。この評価の差は馬の環境や活動に対する適応の高さによるものと考えられる。D 群の馬は、日ごろから子供を乗せて森の中やアップダウンの多い環境などで活動を行っている。このことから、環境による外部からの刺激よりも、活動自体に意識している状態が多いのではないかと考えられる。Viklund らの研究

(2010) によると、4 歳時に評価された気質調査を、生涯にわたってテストした結果、主に使われた競技種目の違いによって馬の気質や遺伝的評価が変わることを報告している。このことから、日ごろの活動によって馬自身にも変化が起こることが考えられる。

また、自由記述においても、D 群の馬には安心や安定といったワードが多かったことから馬の「理解力」はプラスの面で重要視され、「興奮性」や「神経質」は低くすべき、あるいは素質として良くない個体であると評価されているように推察された。一方、「愛着」が低かったことは、ホースセラピーや馬介在活動において用いられる馬は、特定の人に対する「愛着」よりも、誰にでも同様の「愛着」を示すことを求められると考えられる。障害者乗馬や馬介在活動において、多くの場合、リーダー（ハンドラー）、サイドウォーカー、インストラクターといった多くの人が、騎乗者 1 人に対して一緒に活動を行う。このことから、馬には多くの人に慣れ親しんでもらう必要があり、素質として、あるいはトレーニングの効果や積み重ねによって誰にでも扱いやすいようになった馬が好まれると考えられる。馬が誰にでも「愛着」を示すことは、馬自身がより多くの利用者に対して人馬一体となる環境を作りやすくするとも考えられる。気質調査による他の項目にお

いて「友好的」に関しても得点が高かったことは、「愛着」や「友好的」といった要素は人と馬とが関わる中でも重要な要素であることは間違いない。一方、「茶目っ気」「好奇心」といった項目は馬が様々な活動においてニュートラルな状態であることが評価され、障害者乗馬や馬介在活動に用いる馬に対して、外的な刺激に対する反応の低さとして求められる要素と思われる。しかし、馬には個体差があり、そのことを正しく認識し、調教に生かすためには、誰にでも理解できる客観的な指標が不可欠である。

本実験において、人との親和性の指標となるオキシトシンややる気をもたらすドーパミンなどの評価は、馬の特性を理解する大きな助けとなる。またインストラクターが「その馬にとって得意ではない」と判断していた行動や運動負荷の高い運動を求めている時は、馬自身もオキシトシンやドーパミンが減少していたことから、調教の内容や強度を考えるうえで貴重なものとなる。

また、本研究において馬の品種と特性には関係性が見られなかったことから、馬の選択において品種に対する先入観よりも、個体の特性を要素として判断することが馬の選択において重要であると考えられる。

5. 小 括

第3章の研究から、涙液からオキシトシンが検出され、これらは評価に用いるには十分な値だった。また、全ての馬の値をもとに比較を行った結果、統計的な有意差は得られなかったが、オキシトシンやコルチゾール、ドーパミンの増減には明らかな個体差があることが分かった。また、馬が強い運動や得意ではないことをインストラクターが要求したときに、オキシトシンやドーパミンは明らかに減少していた。

また、アンケート調査から、障害者乗馬や馬介在活動に用いられる馬は「理解力」が高い個体が多いことが分かった。飼育者やインストラクターは「理解力」の高さを重要とし

ており、「興奮性」や「神経質」は改善あるいは回避したい項目であることが分かった。

また、「友好的」であることも、馬に対して求める項目であることが分かった。

本章から、馬の個別の特性を評価するにはオキシトシンやドーパミン、コルチゾールの測定が特に重要であると思われた。また、個体において平常値が高い馬と、そうでない馬がいることも明らかとなり、これは馬の素質として重要な指標であると考えられる。

6. 図表等

資料 3-1 気質調査表

記入日 _____ 記入者名 _____

個体名 _____

項目	基準	点数	基準
茶目っ気	全く当てはまらない(1点)		とても当てはまる(5点)
好奇心	全く当てはまらない(1点)		とても当てはまる(5点)
友好的	全く当てはまらない(1点)		とても当てはまる(5点)
神経質	全く当てはまらない(1点)		とても当てはまる(5点)
興奮性	全く当てはまらない(1点)		とても当てはまる(5点)
頑固	従順(1点)		頑固(5点)
愛着	誰にでも(1点)		特定(5点)
理解力	乏しい(1点)		優れている(5点)

次の空欄に記入をお願いいたします。

- ・記入者がこの個体を使う頻度はどのくらいですか 週 回
- ・この馬と関わる中で、個体の特徴はなんですか。簡単にお答えください
- ・この馬を選ぶポイントは何ですか

個体名 _____

項目	基準	点数	基準
茶目っ気	全く当てはまらない(1点)		とても当てはまる(5点)
好奇心	全く当てはまらない(1点)		とても当てはまる(5点)
友好的	全く当てはまらない(1点)		とても当てはまる(5点)
神経質	全く当てはまらない(1点)		とても当てはまる(5点)
興奮性	全く当てはまらない(1点)		とても当てはまる(5点)
頑固	従順(1点)		頑固(5点)
愛着	誰にでも(1点)		特定(5点)
理解力	乏しい(1点)		優れている(5点)

次の空欄に記入をお願いいたします。

- ・記入者がこの個体を使う頻度はどのくらいですか 週 回
- ・この馬と関わる中で、個体の特徴はなんですか。簡単にお答えください
- ・この馬を選ぶポイントは何ですか

ご協力ありがとうございました。

表 3-1 使用馬

	品種	性別	年齢	飼育施設
A1	アラブ	セン	26	東京農業大学
A2	北海道和種	セン	13	バイオセラピーセンター
A3	アパルーサ	牝	17	
A4	シェットランドポニー	牝	16	
B1	木曾	セン	24	麻布大学
B2	ポニー	牝	19	介在動物学研究室
B3	ポニー	牝	19	
C1	日本ポニー	牝	15	帝京科学
C2	中間種	牝	22	うま介在活動センター
C3	ハフリンガー	セン	17	
D1	ポニー	牝	18	NPO法人
D2	ポニー	牝	21	EPO
D3	クウォーター	牝	15	
D4	ポニー	牝	28	
D5	ポニー	セン	27	
D6	北海道和種	セン	20	
D7	ポニー	セン	14	

表3-2 オキシトシン, ドーパミン, コルチゾールのそれぞれPreとPostの比較を対応のあるt検定を用いて行った結果

	オキシトシン (pg/mL)				ドーパミン (pg/mL)				コルチゾール (µg/mL)			
	Pre		Post		Pre		Post		Pre		Post	
	Mean ± SD	Mean ± SD	P		Mean ± SD	Mean ± SD	P		Mean ± SD	Mean ± SD	P	
A1	9.34 ± 20.56	15.67 ± 34.68			431.24 ± 270.34	256.51 ± 108.08			0.20 ± 4.15	0.20 ± 4.40		
A2	22.13 ± 37.60	5.46 ± 14.09			130.49 ± 21.32	106.13 ± 33.21			0.22 ± 3.76	0.22 ± 1.98		
A3	0.14 ± 0.02	0.28 ± 0.35			171.58 ± 83.89	162.50 ± 86.66	0.06		0.25 ± 0.71	0.23 ± 1.27		0.06
A4	0.16 ± 0.04	11.16 ± 26.91			237.14 ± 24.33	226.03 ± 11.11			0.25 ± 0.87	0.27 ± 9.90		
B1	171.68 ± 74.43	230.78 ± 114.89	0.04		205.12 ± 153.01	67.97 ± 50.74	0.01		1.16 ± 0.71	0.87 ± 0.64		0.01
B2	48.26 ± 12.89	38.00 ± 7.14			108.74 ± 81.10	12.61 ± 15.27	0.03		3.56 ± 1.13	4.40 ± 1.05		0.03
B3	58.36 ± 22.12	44.88 ± 21.66			48.09 ± 35.87	23.89 ± 17.80	0.06		3.20 ± 0.46	4.58 ± 1.14		0.06
C1	67.19 ± 10.24	87.32 ± 63.21			26.90 ± 0.00	E			0.91 ± 0.39	0.24 ± 0.25		
C2	64.04 ± 23.20	72.60 ± 46.31			65.05 ± 0.00	164.86 ± 0.00			0.07 ± 0.10	0.47 ± 0.28		
C3	54.64 ± 19.64	69.81 ± 37.11			E	E			E	E		
D1	86.36 ± 30.27	50.02 ± 25.12			316.18 ± 0.00	139.58 ± 165.24			0.98 ± 0.40	0.90 ± 1.09		
D2	101.34 ± 36.52	48.67 ± 23.51			1.52 ± 0.00	0.60 ± 0.00	0.02		1.03 ± 0.57	0.35 ± 0.31		0.02
D3	60.16 ± 5.00	31.13 ± 0.00			135.57 ± 190.78	18.00 ± 23.96			0.66 ± 0.65	0.16 ± 0.21		
D4	110.57 ± 9.74	63.22 ± 39.00			175.08 ± 134.90	31.85 ± 4.38			3.23 ± 5.45	7.60 ± 14.11		
D5	103.10 ± 62.55	72.20 ± 45.97			297.90 ± 419.93	29.33 ± 40.78			1.31 ± 1.25	0.31 ± 0.26		
D6	149.20 ± 48.70	100.22 ± 30.46			208.23 ± 0.00	176.99 ± 0.00			1.17 ± 1.01	0.23 ± 0.31		

P値は0.06以下のものを示す。Eは検出ができなかったことを示す。

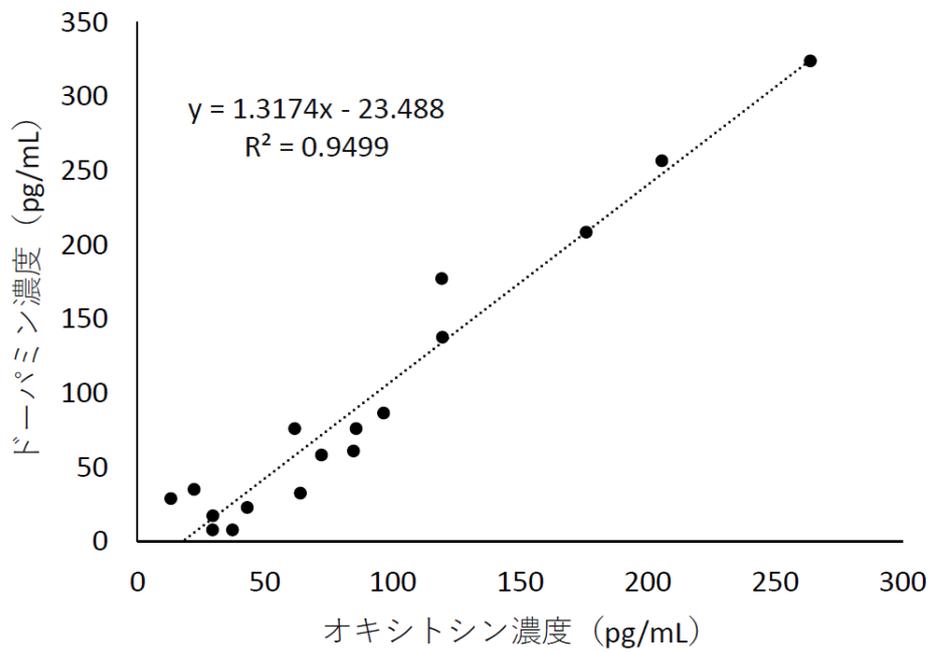


図 3-1 オキシトシンとドーパミンの相関図

スピアマンの順位相関係数を用いて検定を行った結果，オキシトシンとドーパミンの濃度は有意な正の相関を示した ($r_s=0.7$, $P<0.01$)。

表 3-3 気質調査の結果

	茶目っ気	好奇心	友好的	神経質	興奮性	頑固	愛着	理解力
A1	<u>4.0</u>	<u>4.0</u>	<u>4.0</u>	1.7	2.3	1.3	1.3	2.7
A2	3.7	<u>4.3</u>	<u>4.0</u>	3.0	3.7	3.7	2.7	3.7
A3	2.3	2.3	<u>2.0</u>	<u>4.7</u>	3.0	<u>4.3</u>	3.7	3.3
A4	3.3	2.7	2.3	<u>4.0</u>	2.3	<u>5.0</u>	<u>4.3</u>	<u>4.0</u>
B1	2.0	2.0	3.0	1.0	1.0	<u>4.0</u>	3.0	3.0
B2	3.0	3.0	<u>5.0</u>	2.0	1.0	1.0	1.0	<u>5.0</u>
B3	3.0	3.0	<u>5.0</u>	2.0	1.0	1.0	1.0	<u>5.0</u>
C1	<u>4.0</u>	<u>4.5</u>	<u>4.0</u>	3.5	<u>4.5</u>	<u>4.0</u>	2.0	2.0
C2	1.5	2.0	3.5	2.5	2.5	3.5	2.5	<u>4.5</u>
C3	<u>4.5</u>	3.0	3.0	2.5	2.5	3.0	2.0	<u>4.0</u>
D1	3.5	3.5	3.5	2.0	2.5	2.5	2.5	3.8
D2	2.8	3.0	3.0	3.3	2.0	3.5	3.5	<u>4.8</u>
D3	3.0	2.0	3.5	<u>4.0</u>	3.0	3.0	2.3	3.5
D4	3.3	3.3	2.8	2.3	2.8	3.3	3.3	<u>4.0</u>
D5	2.3	2.8	3.5	2.8	2.5	2.3	2.0	3.8
D6	2.8	3.3	3.8	2.3	2.3	3.3	2.8	<u>4.0</u>
D7	<u>4.3</u>	<u>4.3</u>	3.5	2.3	2.8	2.8	3.3	<u>4.0</u>

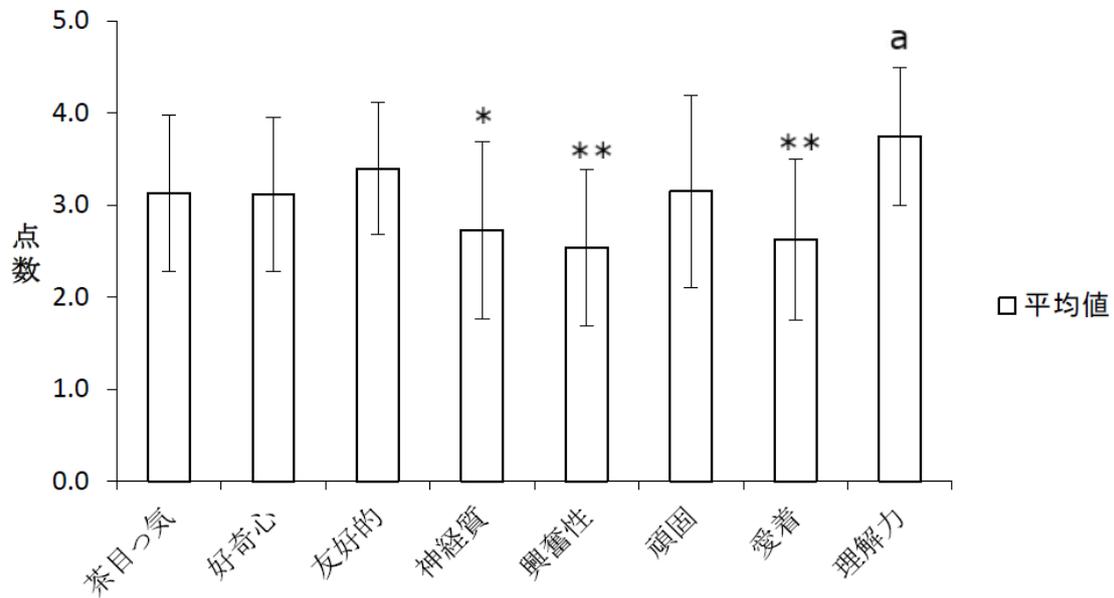
各項目において、点数が 4.0～5.0 の値は高得点群として示す。

表 3-4 理解力の点数とオキシトシン，ドーパミン，コルチゾールの Pre の平均値の表

	理解力	Pre		
		オキシトシン (pg/mL)	ドーパミン (pg/mL)	コルチゾール (μ g/mL)
A1	2.7	9.34	431.24	0.20
A2	3.7	22.13	130.49	0.22
A3	3.3	0.14	171.58	0.25
A4	4.0	0.16	237.14	0.25
B1	3.0	171.68	205.12	1.16
B2	5.0	48.26	108.74	3.56
B3	5.0	58.36	48.09	3.20
C1	2.0	67.19	26.90	0.91
C2	4.5	64.04	65.05	0.07
C3	4.0	54.64	E	E
D1	3.8	86.36	316.18	0.98
D2	4.8	101.34	1.52	1.03
D3	3.5	60.16	135.57	0.66
D4	4.0	110.57	175.08	3.23
D5	3.8	103.10	297.90	1.31
D6	4.0	149.20	208.23	1.17
D7	4.0	E	E	E

各項目において，Eは検出できなかったことを示す。

図 3-1 アンケートの項目を一元配置の分散分析および Tukey-Kramer 法を用いて比較した結果



理解力 (a) に対して、興奮性と愛着が有意に低かった ($P < 0.01$)。次いで神経質の項目が有意に低かった ($P < 0.05$)。

表 3-5 使用による馬の反応の違い

個体	物質	通常		苦手なもの	
		Pre (pg/mL)	Post (pg/mL)	Pre (pg/mL)	Post (pg/mL)
C2	OT	64.04	72.6	96.85	46.21
D6	OT	186.27	120.49	78.69	48.52
B1	DA	205.12	67.97	32.4	10.7

OT=オキシトシン DA=ドーパミン

第4章 総括

本研究は、涙液中には血漿とほぼ同様の成分が含まれており、生理的変化の指標として十分活用が可能であることを明らかにした。涙液にはストレス指標となるコルチゾール、ノルアドレナリン、アドレナリンのほか、人との親和性の度合いを示すオキシトシンも存在する。現状では血液中のセロトニンを抽出する適当な方法はなく、測定は容易ではない。また、血小板にセロトニンは含まれることから、全血と血漿では検出結果が大きく異なる。しかし、涙液はほぼ原液のまま HPLC で測定でき、ドーパミンのみならずセロトニンの測定も可能であることが本研究で分かった。

サンプリングのストレスを減らすことは、馬の生理的変化をとらえるためには欠かせない。涙液の採取の場合、採血のような痛みはもちろんない。さらに、ほとんどの馬が採取に対する拒否反応を示さない。ろ紙を瞬膜に挟んでしまえば、馬が多少動いてもろ紙はとれない。さらに涙液がろ紙にしっかりたまと、ろ紙は瞼から離れ易くなるため、回収にも負担がかからない。

このように馬にとっても楽な状態でサンプリングを行うことは、ストレス評価だけでなく、病理的評価にも十分応用が可能であると考えられる。馬が罹患することが多いクッシング症候群の評価には、ドーパミンやセロトニン、コルチゾールのレベルを評価している研究が多い (McFarlane et al., 2003; McGowan & Neiger, 2003)。これらの研究は血漿や血清を用いるものがほとんどであるが、セロトニンの測定には血小板の数に影響されることに留意すべき (Haritou et al., 2008) と述べている。しかし、本研究のように涙液を用いて測定を行えば、血小板濃度を考慮する必要もなく、より正確なセロトニンの測定が可能であると考えられる。そのためにも、馬の涙液中のセロトニン量の標準値を様々な品種や体格において研究する必要がある。

人と動物の相互作用に関して、犬と人との関係に関しては多くの報告がある。特に人と犬におけるオキシトシンは重要である。オキシトシンは、犬も人と同様の変化があると報告（Nagasawa et al., 2015）されており、また活動を通して唾液中コルチゾールが有意に増減したとの報告（Polheber & Matchock, 2014）もある。これらの物質は動物種が異なっているとしても、生体内では同様の内的変化が起こっている可能性は高い。しかし、犬と同様に介在活動や介在療法に用いられる馬の知見は犬に比べるときわめて少ない。しかし、涙液を用いてオキシトシンやコルチゾールの測定を行うことで、馬の即時的な変化を評価することができるとともに、それぞれの馬の特性の違いを明らかとすることができる。涙液を用いることで、馬の研究が格段に容易になることは間違いない。このことは障害者乗馬の普及にも大きく貢献することになる。

本研究において、涙液中に含まれたオキシトシンの濃度に個体差がみられた。オキシトシンはその発見以来、「母子の絆」、「性愛行動」、「仲間との信頼」、そして「心の安定」、「身体の健康」に関係していると考えられている。健康の増進はもちろんのこと、対人関係の向上、信頼獲得の強化、不安・心配の軽減をもたらすホルモンである。人にオキシトシンを経鼻投与（噴霧）すると他人を信頼する度合いが上昇する（Anagnostou et al., 2014）。また、オキシトシンは高次機能自閉症（アスペルガー）患者の社会性を改善した（Andari et al., 2010）という。

このオキシトシンは、人と犬との関わりにおいても重要な役割を果たしていることがNagasawaらの研究（2009, 2015）で明らかとなった。さらに、犬でも分泌され（Mitsui et al., 2011）、人と相互に高めあう増強強化（Nagasawa et al., 2015）があることも分かった。

2016年、イギリスの国営放送BBCが制作したドキュメンタリー「Cats VS Dogs」で、10頭の犬と10頭の猫が参加し、彼らのオキシトシンの湧き出る量を比べる実験が行われた。実験では、それぞれの犬と猫がなついている飼い主と遊ぶ前、そして遊んだ後の血液中のオキシトシンレベルを測定し、比較したという。その結果、犬も猫の両者とも飼

い主と遊んだ後はオキシトシンが上がり、特に犬に関しては平均 57%のオキシトシンの上昇がみられた。一般的に人と人との場合、見知らぬ人と楽しく交流したときは 12~25%のオキシトシンの上昇がみられ、知り合いだと 25~20%、愛する自分の配偶者や子供の場合だと 50%以上の上昇がみられるという。ネコは 12%の上昇と、犬の 5分の1 以下ほどの値だった。これらの実験結果をみると、猫が人に対してクールだと言われる理由が分かる。その実験を担当した神経科学者のポール・ザック博士は「犬は猫よりも 5倍近く愛情を人間に対して向けることが分かりました」と述べ、そして「犬は飼い主をととても愛しています。中でも注目すべきなのは、犬が仲間の犬にではなく別の種である人間に対してオキシトシンを分泌している点です。犬たちの脳が、異種である私たち人間を愛していると言っているのです。すごいことです。」と語っている。そして、実験により「犬の飼い主に対する愛情というのは非常に強いことが科学的に証明されたこととなります」とその結果を分析している。本研究で、涙液中ではあるが、馬のオキシトシンの平均濃度は 81.7pg/mL であり、犬の平常時 (218.1pg/mL, 唾液中) の 3/5 程度と推測できる。

未だ研究が十分ではないにしても、動物介在療法や活動に使われる動物は、高い親和性 (オキシトシンの高いレベル) が求められる。

また、オキシトシンとドーパミンのレベルが同様に変化をした。つまり、ドーパミンにも個体差があることが示された。

ドーパミンは学習や運動機能、性機能、向上心などに関係し、達成感による快楽を得ることでさらなる意欲をもたらす。ドーパミンが低下すると、物事への関心が低下する。これらのことから、馬の潜在的なやる気には個体差があり、おそらくドーパミンレベルが高い馬の方がよりやる気があることが推察される。馬のやる気はインストラクターや騎乗者、トレーニングによってさまざまに変化し、この馬のやる気と人との活動のマッチングが重要であることが強く示唆された。また、ドーパミン D4 受容遺伝子と馬の気質には関係があった (Ninomiya et al., 2013) ことが報告されている。

セロトニンは精神を安定させ、幸福感を生み出すホルモンとしてアドレナリンとドーパミンがバランスよく働くようコントロールする働きを担っている。セロトニンが不足すると疲れやすく意欲がなくなる。セロトニンが検出された馬のなかで、神経質といわれた馬は、活動後にセロトニンが減少していた。他の馬においては、運動前後での変化はなかったことから、負の精神状況である馬には放牧や休養といった適切なアプローチを行う手がかりになると思われる。さらに休養や放牧からの復帰のタイミングにおいても、馬の行動からのみではなく、馬に寄り添ったタイミングを見出すことができると考えられる。

また、トレーニングの方法によって馬の愛着（不安と回避）には差が生まれることが報告されている。本研究の手法を用いることで、トレーニングによって馬が人に対してより愛着をもつのか、馬の素質として愛着が高かったのか、トレーニングの過程での変化をオキシトシンのレベルで評価が可能となった。さらに、トレーニングと気質の関係から、馬の選択において品種よりも個体の資質を重視することが重要であると考えられる。特に馬は、競走馬としての利用から馬術競技や介在活動、さらにはペットまでといった幅の広い飼育が行われている。またこれらの馬は生きていく中で転用されることが多く、もちろんトレーニングもその都度変わる。日本における馬の生産は競走馬として生産されることが多く、サラブレッドがほとんどである。一方、当初から乗用馬として生産されるものは競走馬に比べると少なく、特に日本在来種は減少傾向にある。サラブレッドも競走馬を引退したのちは乗用馬として活用されることがほとんどであり、これには多くの時間がかかる。この転用のリトレーニング時期に、馬の気質評価やオキシトシンやドーパミンの測定を行うことで、馬の適性を客観的に判断し、今後の使用方法にさらなる広がりが見られると考えられる。また、競技あるいは馬介在活動用としてのリトレーニングにおいても、効果的なプログラムが構築できると考えられる。他にも在来馬の用途拡大において、本研究のような特性評価を行うことで販路の拡大や利用の増加が可能と考えられ、同時に生産数や種の保存の一助となると考えられる。特に障害者乗馬や馬介在活動、競技や趣味で行う馬術においても初心者が乗る練習馬には、親和性が高くストレス耐性があり、かつ誰にで

も愛着を持つ馬が好まれる。これらの要素を客観的にも示すことで、転用や購入がスムーズになると考えられる。

今後、馬の適性や選択に関してトレーニング状況やトレーニングを始める時期などの要素も考慮し、さらなる研究が必要であると考えられる。また、馬の用途や品種に関しても、様々な条件下で利活用されている馬のデータを採取することで、馬の選択や活用方法をより広げることにつながると考える。

本研究は障害者乗馬に用いる馬の特性評価に有益であり、またこれまでの主観的な評価によって選択されてきた人と馬のマッチングをより科学的な方法で行えることを明らかにした。

結 論

本研究により、非侵襲に計測できる新たな生理的指標として、涙液が極めて重要であると言える。ストレス指標として広く用いられているコルチゾールだけでなく、神経伝達物質であるカテコールアミン、さらに血液や血漿からは測定が難しいセロトニンが検出されたのは大きな成果と言える。また、涙液中のノルアドレナリンと LF/HF 値には有意な相関があったことから涙液中の神経伝達物質の信頼性は高い。この発見により、馬の精神的な状態をより生理学的に、客観的に評価することが可能となった。

さらに、涙液中からオキシトシンが検出された。オキシトシンは人と動物の関わりを評価するうえで重要な物質である。検出されたオキシトシンは、情動との関係があるドーパミンとの強い関わりを示した。ドーパミンは学習や運動機能、性機能、向上心などに関係し、達成感による快楽を得ることでさらなる意欲をもたらす。これらの物質をもとに生理的指標を行うことは、人と動物の関係を明らかとする上で大変重要な要素となる。

さらに、オキシトシンとドーパミンには個体差が顕著であることが判明した。また、障害者乗馬に用いる馬の中には、オキシトシンとドーパミンの基礎値が高い馬が潜在的に

存在していたことが明らかとなった。このことから、馬の特性評価や適性に関して、より客観的に判断することができる上に、調教やトレーニング、人との相性なども客観的に判断が可能になったといえる。

これらのことから、馬の特性評価と選択において、涙液による生理的評価は十分有用であるといえる。

本研究の成果は障害者乗馬に用いる馬の特性評価に有益であり、またこれまでの主観的な評価によって選択されてきた人と馬のマッチングを、涙液中のオキシトシンやドーパミンの濃度測定を行うことで、より科学的な方法で評価できることを明らかにした。

引用文献

Anagnostou, E., Soorya, L., Brian, J., Dupuis, A., Mankad, D., Smile, S., & Jacob, S.. (2014). Intranasal oxytocin in the treatment of autism spectrum disorders: a review of literature and early safety and efficacy data in youth. *Brain Research*, **1580**, 188-198.

Adams, D. L. (1997). Animal-assisted enhancement of speech therapy: A case study. *Anthrozoös*, **10**(1), 53-56.

Alberghina, D., Rizzo, M., Piccione, G., Giannetto, C., & Panzera, M. (2017). An exploratory study about the association between serum serotonin concentrations and canine-human social interactions in shelter dogs (*Canis familiaris*). *Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research*, **18**, 96-101.

Andari, E., Duhamel, J. R., Zalla, T., Herbrecht, E., Leboyer, M., & Sirigu, A. (2010). Promoting social behavior with oxytocin in high-functioning autism spectrum disorders. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**(9), 4389-4394.

Bass, M. M., Duchowny, C. A., & Llabre, M. M., (2009). The effect of therapeutic horseback riding on social functioning in children with autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, **39**(9), 1261-1267.

Bertoti, D. B. (1988). Effect of therapeutic horseback riding on posture in children with cerebral palsy. *Physical Therapy*, **68** (10), 1505–1512.

- Bruschetta, G., Fazio, E., Cravana, C., & Ferlazzo, A. M., (2017). Effects of partial versus complete separation after weaning on plasma serotonin, tryptophan and pituitary-adrenal pattern of Anglo-Arabian foals. *Livestock Science*, **198**, 157-161.
- Burgon, H. (2003). Case studies of adults receiving horse-riding therapy. *Anthrozoös*, **16** (3), 263-276.
- Caprilli, S., & Messeri, A. (2006). Animal-assisted activity at A. Meyer Children's Hospital: a pilot study. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **3** (3), 379-383.
- Carlson, L. A., Froberg, S., & Persson, S., (1965). Concentration and turnover of the free fatty acids of plasma and concentration of blood glucose during exercise in horses. *Acta Physiologica*, **63**(4), 434-441.
- Chu, C. I., Liu, C. Y., Sun, C. T., & Lin, J. (2009). The effect of animal-assisted activity on inpatients with schizophrenia. *Journal of Psychosocial Nursing and Mental Health Services*, **47**(12), 42-48.
- Crockett, M. J., Clark, L., Hauser, M. D., & Robbins, T. W. , (2010). Serotonin selectively influences moral judgment and behavior through effects on harm aversion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**(40), 17433-17438.

Dwyer, C. M., Gilbert, C. L., & Lawrence, A. B. (2004). Prepartum plasma estradiol and postpartum cortisol, but not oxytocin, are associated with interindividual and breed differences in the expression of maternal behaviour in sheep. *Hormones and Behavior*, **46**(5), 529-543.

Finkenwirth, C., Martins, E., Deschner, T., & Burkart, J. M. (2016). Oxytocin is associated with infant-care behavior and motivation in cooperatively breeding marmoset monkeys. *Hormones and Behavior*, **80**, 10-18.

Gamaro, G. D., Manoli, L. P., Torres, I. L. S., Silveira, R., & Dalmaz, C., (2003). Effects of chronic variate stress on feeding behavior and on monoamine levels in different rat brain structures. *Neurochemistry International*, **42**(2), 107-114.

Goldmeier, J. (1986). Pet or people: Another research note. *Gerontologist*, **26**, 203-206.

Guastella, A. J., Einfeld, S. L., Gray, K. M., Rinehart, N. J., Tonge, B. J., Lambert, T. J., & Hickie, I. B., (2010). Intranasal oxytocin improves emotion recognition for youth with autism spectrum disorders. *Biological Psychiatry*, **67**(7), 692-694.

Gundlach, N. H., Piechotta, M., and Siebert, U., (2014). Is Lachrymal Fluid a Potential Method for Cortisol Measurement in Wild Harbourseals?: A Pilot Study. *International Journal of Veterinary Medicine: Research & Reports*. DOI: 10.5171/2014.967043

- Halter, J. B., Pflug, A. E., & Porte, Jr. D., (1977). Mechanism of plasma catecholamine increases during surgical stress in man. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **45**(5), 936-944.
- Han, J Y., Kim, J M., Kim, S K., Chung, J S., Lee, H C., Lim, J K., Lee, J., Park, K Y., (2012). Therapeutic effects of mechanical horseback riding on gait and balance ability in stroke patients. *Annals of Rehabilitation Medicine*, **36**(6), 762-769.
- Handlin, L., Hydbring-Sandberg, E., Nilsson, A., Ejdebäck, M., Jansson, A., & Uvnäs-Moberg, K. (2011). Short-term interaction between dogs and their owners: effects on oxytocin, cortisol, insulin and heart rate—an exploratory study. *Anthrozoös*, **24** (3), 301-315.
- Haritou, S. J. A., Zylstra, R., Ralli, C., Turner, S., & Tortonese, D. J. (2008). Seasonal changes in circadian peripheral plasma concentrations of melatonin, serotonin, dopamine and cortisol in aged horses with Cushing's disease under natural photoperiod. *Journal of Neuroendocrinology*, **20**(8), 988-996.
- Hart, K. A., Kitchings, K. M., Kimura, S., Norton, N. A., and Myrna, K. E., (2016). Measurement of cortisol concentration in the tears of horses and ponies with pituitary pars intermedia dysfunction. *American Journal of Veterinary Research*, **77**(11) , 1236-1244.
- Holsboer, F., & Ising, M. (2010). Stress hormone regulation: biological role and translation into therapy. *Annual Review of Psychology*, **61**, 81-109.

- Kaiser, L., Heleski, C. R., Siegford, J., & Smith, K. A. (2006). Stress-related behaviors among horses used in a therapeutic riding program. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **228**(1), 39-45.
- Kalin, N. H., & Shelton, S. E., (2003). Nonhuman primate models to study anxiety, emotion regulation, and psychopathology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1008**(1), 189-200.
- Kawamura, N., Niiyama, M., & Niiyama, H. (2009). Animal-assisted activity: experiences of institutionalized Japanese older adults. *Journal of Psychosocial Nursing and Mental Health Services*, **47**(1), 41-47.
- Kurosawa, M., Nagata, S. I., Takeda, F., Mima, K., Hiraga, A., Kai, M., & Taya, K. (2001). Plasma catecholamine, adrenocorticotropin and cortisol responses to exhaustive incremental treadmill exercise of the Thoroughbred horse. *Journal of equine science*, **9**(1), 9-18.
- Kvetňanský, R., & Mikulaj, L., (1970). Adrenal and urinary catecholamines in rats during adaptation to repeated immobilization stress. *Endocrinology*, **87**(4), 738-743.
- Lansade, L., & Simon, F., (2010). Horses' learning performances are under the influence of several temperamental dimensions. *Applied Animal Behaviour Science*, **125** (1), 30-37.

- Lansade, L., Bouissou, M. F., and Erhard, H. W., (2008) . Fearfulness in horses: A temperament trait stable across time and situations. *Applied Animal Behaviour Science*, **115** (3) , 182-200.
- Laskar, M. S., Iwamoto, M., Nakamoto, M., Koshiyama, H., & Harada, N., (2004). Heart rate variation and urinary catecholamine excretion in response to acute psychological stress in hand-arm vibration syndrome patients. *Journal of occupational health*, **46**(2), 125-131.
- Sacchetti, M., Micera, A., Lambiase, A., Speranza, S. Mantelli, F., Petrachi, G., Bonini, S., & Boninicorresponding. S., (2011) . Tear levels of neuropeptides increase afterspecific allergen challenge in allergic conjunctivitis. *Molecular Vision*, **17**:47-52
- Martin, F., & Farnum, J., (2002). Animal-assisted therapy for children with pervasive developmental disorders. *Western Journal of Nursing Research*, **24** (6), 657-670.
- McFarlane, D., Donaldson, M. T., Saleh, T. M., & Cribb, A. E., (2003). The role of dopaminergic neurodegeneration in equine pituitary pars intermedia dysfunction (equine Cushing's disease). In *Proceedings of the 49th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners, New Orleans, Louisiana, USA, 21-25 November 2003* (pp. 233-237). American Association of Equine Practitioners (AAEP).
- McGowan, C. M., & Neiger, R., (2003). Efficacy of trilostane for the treatment of equine Cushing's syndrome. *Equine Veterinary Journal*, **35** (4), 414-418.

- Mitsui, S., Yamamoto, M., Nagasawa, M., Mogi, K., Kikusui, T., Ohtani, N., & Ohta, M. (2011). Urinary oxytocin as a noninvasive biomarker of positive emotion in dogs. *Hormones and behavior*, **60**(3), 239-243.
- Mehl, M. L., Schott, H. C., Sarkar, D. K., & Bayly, W. M., (2000). Effects of exercise intensity and duration on plasma β -endorphin concentrations in horses. *American Journal of Veterinary Research*, **61** (8), 969-973.
- Momozawa, Y., Ono, T., Sato, F., Kikusui, T., Takeuchi, Y., Mori, Y., & Kusunose, R., (2003) . Assessment of equine temperament by a questionnaire survey to caretakers and evaluation of its reliability by simultaneous behavior test. *Applied Animal Behaviour Science*, **84** (2) , 127-138.
- Monk, C. S., Hart, K. A., Berghaus, R. D., Norton, N. A., Moore, P. A., & Myrna, K. E., (2014) . Detection of endogenous cortisol in equine tears and blood at rest and aftersimulated stress. *Veterinary Ophthalmology*, **17** (s1) , 53-60.
- Mormede, P., Moneva, E., Bruneval, C., Chaouloff, F., & Moisan, M. P. (2002). Marker - assisted selection of a neuro - behavioural trait related to behavioural inhibition in the SHR strain, an animal model of ADHD. *Genes, Brain and Behavior*, **1** (2), 111-116.
- Nagasawa, M., Kikusui, T., Onaka, T., & Ohta, M., (2009). Dog's gaze at its owner increases owner's urinary oxytocin during social interaction. *Hormones and Behavior*, **55**(3), 434-441.

- Nathans-Barel, I., Feldman, P., Berger, B., Modai, I., & Silver, H., (2005). Animal-assisted therapy ameliorates anhedonia in schizophrenia patients. *Psychotherapy and Psychosomatics*, *74* (1), 31-35.
- Negrão, J. A., & Marnet, P. G., (2006). Milk yield, residual milk, oxytocin and cortisol release during machine milking in Gir, Gir× Holstein and Holstein cows. *Reproduction Nutrition Development*, *46*(1), 77-85.
- Ninomiya, S., Anjiki, A., Nishide, Y., Mori, M., Deguchi, Y., & Satoh, T., (2013). Polymorphisms of the dopamine D4 receptor gene in stabled horses are related to differences in behavioral response to frustration. *Animals*, *3*(3), 663-669.
- O'Haire, M. E., McKenzie, S. J., McCune, S., & Slaughter, V., (2014). Effects of classroom animal-assisted activities on social functioning in children with autism spectrum disorder. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, *20*(3), 162-168.
- Ohtani, N., Kitagawa, K., Mikami, K., Kitawaki, K., Akiyama, J., Fuchikami, M., Uchiyama, H., & Ohta, M., (2017). Horseback riding improves the ability to cause the appropriate action (go reaction) and the appropriate self-control (no-go reaction) in children. *Frontiers in Public Health*, *5*.
- Ory, M. G., & Goldberg, E. L., (1983). Pet possession and well-being in elderly women. *Research on Aging*, *5*(3), 389-409.

- Katcher A. H. & Beck A., (Eds.), *New perspectives on our life with companion animals*
Philadelphia: *University of Pennsylvania Press*. (pp. 803-817).
- Pell, S. M., & McGreevy, P. D., (1999). A study of cortisol and beta-endorphin levels in stereotypic and normal Thoroughbreds. *Applied Animal Behaviour Science*, **64**(2), 81-90.
- Piven, J., Tsai, G., Nehme, E., Coyle, J. T., Chase, G. A., & Folstein, S. E., (1991) . Platelet serotonin, a possible marker for familial autism. *Journal of Autism and Developmental Disorders*, **21** (1), 51-59.
- Podolak, M., Kedzierski, W., & Bergero, D., (2006). Comparison of the blood plasma catecholamines level in thoroughbred and Arabian horses during the same-intensity exercise. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, **9**(1), 71-73.
- Polheber, J. P., & Matchock, R. L., (2014). The presence of a dog attenuates cortisol and heart rate in the Trier Social Stress Test compared to human friends. *Journal of Behavioral Medicine*, **37**(5), 860-867.
- Rose, R. J., ARNOLD, K. S., CHURCH, S., & Paris, R., (1980) . Plasma and sweat electrolyte concentrations in the horse during long distance exercise. *Equine Veterinary Journal*, **12** (1) , 19-22.

- Scheidhacker, M., Bender, W., & Vaitl, P., (1991). The effectiveness of therapeutic horseback-riding in the treatment of chronic schizophrenic patients. Experimental results and clinical experiences. *Der Nervenarzt*, **62** (5), 283-287.
- Schmidt, A., Aurich, J., Möstl, E., Müller, J., & Aurich, C., (2010) . Changes in cortisol release and heart rate and heart rate variability during the initial training of 3-year-old sport horses. *Hormones and Behavior*, **58** (4) , 628-636.
- Schmidt, A., Hödl, S., Möstl, E., Aurich, J., Müller, J., & Aurich, C., (2010). Cortisol release, heart rate, and heart rate variability in transport-naive horses during repeated road transport. *Domestic Animal Endocrinology*, **39** (3) , 205-213.
- Serpell, J. A., (1996). Evidence for an association between pet behavior and owner attachment levels. *Applied Animal Behaviour Science*, **47**(1-2), 49-60.)
- Sothmann, M. S., Hart, B. A., & Horn, T. S., (1991). Plasma catecholamine response to acute psychological stress in humans: relation to aerobic fitness and exercise training. *Medicine & Science in Sports & Exercise*, **23** (7), 860-867.
- Souter, M. A., & Miller, M. D., (2007). Do animal-assisted activities effectively treat depression? A meta-analysis. *Anthrozoös*, **20** (2), 167-180.
- Spengler, F. B., Scheele, D., Marsh, N., Kofferath, C., Flach, A., Schwarz, S., Wagner, S. B., Maier, W., & Hurlemann, R., (2017). Oxytocin facilitates reciprocity in social communication. *Social cognitive and affective neuroscience*, **12** (8), 1325-1333.

- Stahl, S. M., Woo, D. J., Mefford, I. N., Berger, P. A., & Ciaranello, R. D., (1983).
Hyperserotonemia and platelet serotonin uptake and release in schizophrenia and
affective disorders. *The American Journal of Psychiatry*. **140**(1), 26-30.
- The nature of horses (1997) Stephan Budiansky,"Chapter7 Horse Sense" pp.165
Simon and Schuster INC, U.S.A
- Urhausen, A., Gabriel, H., & Kindermann, W., (1995) . Blood hormones as markers
of training stress and overtraining. *Sports Mmedicine*, **20** (4) , 251-276.
- Van Stegeren, A., Rohleder, N., Everaerd, W., & Wolf, O. T., (2006) . Salivary alpha
amylase as marker for adrenergic activity during stress: effect of betablockade.
Psychoneuroendocrinology, **31** (1) , 137-141.
- Viklund, Å, Braam, Å, Näsholm, A., Strandberg, E., & Philipsson, J., (2010). Genetic
variation in competition traits at different ages and time periods and correlations
with traits at field tests of 4-year-old Swedish Warmblood horses. *Animal*, **4**(5), 682-
691. doi:10.1017/S1751731110000017
- Visser, E. K., Van Reenen, C. G., Van der Werf, J. T. N., Schilder, M. B. H., Knaap, J.
H., Barneveld, A., & Blokhuis, H. J., (2002). Heart rate and heart rate variability
during a novel object test and a handling test in young horses. *Physiology &
Behavior*, **76**(2), 289-296.

- Von Borstel, U. K., Euent, S., Graf, P., König, S., & Gauly, M., (2011) . Equine behaviour and heart rate in temperament tests with or without rider or handler. *Physiology & Behavior*, **104** (3) , 454-463.
- Von Lewinski, M., Biau, S., Erber, R., Ille, N., Aurich, J., Faure, J., Möstl, E., & Aurich, C., (2013) . Cortisol release, heart rate and heart rate variability in the horse and its rider: different responses to training and performance. *The Veterinary Journal*, **197** (2) , 229-232.
- Whalen, C. N., & Case-Smith, J., (2012). Therapeutic effects of horseback riding therapy on gross motor function in children with cerebral palsy: a systematic review. *Physical & Occupational Therapy in Pediatrics*, **32** (3), 229-242.
- Wilkinson, L. O., & Jacobs, B. L. (1988). Lack of response of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus of freely moving cats to stressful stimuli. *Experimental Neurology*, **101** (3), 445-457.
- Wilson, W.M., & Maughan, R.J., (1992). Evidence for a possible role of 5-hydroxytryptamine in the genesis of fatigue in man : administration of paroxetine. a 5-HT re-uptake inhibitor, reduces the capacity to perform prolonged exercise. *Experimental Physiol.* **77** 921-924.
- Zasloff, R. L., & Kidd, A. H., (1994). Loneliness and pet ownership among single women. *Psychological Reports*, **75**, 747-752.

青木佑斗, 神田英治 (2016). 北海道の特別支援教育における障がい者乗馬の活用に関する研究: 知的障がい教育および肢体不自由教育の実践について. *北翔大学北方圏学術情報センター年報* **8**, 155-168.

アショテフテリサ, ホルムストランドアサ (2000). ヒポセラピーと治療的乗馬. *理学療法学*, **27**(4), 115-117.

井澤修平, 城月健太郎, 菅谷渚, 小川奈美子, 鈴木克彦, 野村忍 (2007). 唾液を用いたストレス評価. *日本補完代替医療学会誌*, **4** (3), 91-101.

加藤真紀 (2012). 攻撃行動などの問題行動を呈する犬の神経機構: 食餌療法と新たな行動修正療法の有効性. 麻布大学博士論文 <http://id.nii.ac.jp/1112/00003329/>

慶野裕美, 川喜田健司, 田谷充 (2008). 高齢者における乗馬活動の効果--高齢者, 健常児・者および障害児・者の乗馬活動中の表情変化を比較して. *ヒポファイル*, (34), 14-20.

佐々木昌志, 大木与志雄 (1988). ハタネズミ (*Microtus arvalis*) における涙液蛋白質の特性. *Experimental Animals*, **37** (1), 97-99.

植竹勝治, 大塚野奈, 長田佐知子, 金田京子, 宮本さとみ, 堀井隆行, 福澤めぐみ, 江口祐輔, 太田光明, 田中智夫 (2007). 特別養護老人ホームでの動物介在活動に繰り返し参加した飼い犬のストレス反応. *日本家畜管理学会誌・応用動物行動学会誌*, **43**(4), 192-198.

大塚敦子 (2009) 馬とのかかわりをとおして関係構築を学ぶ. *公衆衛生*, **73**(10), 754-755.

要武志, 村田英一, 太田光明 (2004) . 重複障害児への馬を用いた動物介在活動の試み. *麻布大学雑誌*, **7**, 79.

川又正智 (2005) . 馬の家畜化をめぐる研究動向. *国士舘大学文学部人文学会紀要*, **37**.

クセノポーンの馬術-ヨーロッパ馬術小史 (1995) . 田中秀央, 吉田一次訳 恒星社厚生閣

田中喜秀, 脇田慎一 (2011) . ストレスと疲労のバイオマーカー. *日本薬理学雑誌*, **137**(4) , 185-188.

田中喜秀, 脇田慎一 (2010) . 薬学領域におけるストレス研究の最前線. *ライフサポート*, **22** (3) , 90-95.

津田望, 塚田光子 (2011) . のぞみ牧場学園の乗馬セラピー (特集 馬の活用--乗馬の楽しみとホースセラピーに目を向けて). *畜産の研究*, **65**(1), 98-102.

筒井末春 (2007) . 男性更年期うつ病の心身医学的対応. *臨床泌尿器科*, **61**(1), 47-51.

局博一 (2002) . 乗馬による共生社会の実現. *学術の動向*, **7** (10) , 37-43.

美和千尋, 杉浦玉紀, 慶野宏臣, 慶野裕美 (2005) . 自閉症児における乗馬活動による症状改善と乗馬習得過程—1 自閉症児を通して. *作業療法*, **24** (3), 262-268.

長谷川康弘, 榊澤美紀, 榊澤良和, 小野寺由香, 古川宇一 (1999) . 旭川市における障害者の乗馬: 旭川アルム作業所の乗馬活動を通して障害者は何を得たか. *情緒障害教育研究紀要*, **18**, 183-194.

福田 康一郎 (監修) 小澤瀨司 (2014/4/9) “第13章 視覚”標準生理学. 医学書院, 東京, pp266.

瀨上真帆, 川嶋舟, 内山秀彦 (2012) . 初心者の乗馬における精神的・生理的变化に関する研究. *東京農業大学農学集報*, **57** (3) , 160-166.

瀨上真帆, 内山秀彦, 太田光明 (2018) . 馬の涙液を用いたコルチゾールの測定. *東京農業大学農学集報*, **62** (3・4) , 80-86

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** (3), 375-381.

松本光史, 井上寛暁, 山崎信, 村上斉, 梶雄次 (2012) . 人工消化による赤米および紫黒米の抗酸化能評価と種雌豚への短期給与が酸化ストレス指標に及ぼす影響. *日本養豚学会誌*, **49** (3) , 109-116.

宮川治樹 (2005) . アニマル・セラピーって...?: 動物介在活動総論として (< 小特集> 動物介在活動の現在). 帝塚山大学心のケアセンター紀要, **1**, 39-44.

桃沢幸秀 (2007) . ウマの気質に関する行動遺伝学的研究 (*Doctoral dissertation*, 東京大学)

吉岡豪, 今枝紀明, 鳥本安男, 水野拓 (2001) . 夏季高温時のトラック輸送が豚ストレス感受性遺伝子ヘテロ接合体保有豚と正常豚の直腸温度, 呼吸数, 血清中成分に及ぼす影響. 日本養豚学会誌, **38** (1) , 4-11.

NPO 法人 千葉県ヒューマンセラピー協会 <<http://www.saitou-umaclub.com/>> (最終アクセス 2017 年 12 月 22)

一般財団法人 明石乗馬協会 <<http://www.ara.fm/>> (最終アクセス 2017 年 7 月 15)

一般社団法人 日本障がい者乗馬協会 <<http://jrad.jp/>> (最終アクセス 2017 年 7 月 10)

一般社団法人 ロイヤルアシスタントドッグ <<http://rad.petit.cc/>> (最終アクセス 2017 年 6 月 2)

公益社団法人 日本動物病院協会 <<https://www.jaha.or.jp/>> (最終アクセス 2017 年 10 月 17)

特定非営利活動法人 RDA Japan <<http://rdajapan.or.jp/>> (最終アクセス 2017 年 11

月 5)

特定非営利活動法人 障害者のための馬事普及協会 <<http://www.pirouet-u.com/>> (最終アクセス 2017 年 11 月 5 日)

摘 要

障害者乗馬や馬介在活動における馬そのものの評価は、騎乗者に関する報告に比して、きわめて少ない。人と馬のストレス変化に関して、本番と練習では人と馬に反応の違いがあったことが報告されている一方、障害者乗馬に用いられる馬と一般の乗馬とでは、馬が感じるストレスに差がなかったとの報告もある。また、人との活動において、馬の選択はインストラクターの主観に依存し、馬の体高や体重、サイドウォーカーや騎乗者の体格をもとに、あるいは馬の調教度合いを基準に選択している傾向にある。さらに、年齢は一般的に12歳前後が良いともいわれている。しかし、これらの評価や選択に科学的な指標はなく、経験的に述べられている。

一方、ストレスや共感性に関する研究は観察や聞き取りといった主観的な評価のほか、内的変化をもとに客観的な生理学的評価が用いられている。生理学的評価において、ストレスによって分泌されるホルモンや神経伝達物質の測定には、主に血液などが用いられることが多い。

しかし、採血は動物への負担があり、頻繁な採取には動物へのストレスが少ない非侵襲的な手技による方法での評価が求められる。非侵襲的に測定できる指標には、心拍を用いることが多いが、これらは副次的な反応であることを考慮しなければならない。また、尿や糞は即時的な採取が難しく、唾液は採取後の処理が繁雑であり、いずれも一長一短がある。

これらのことから、本研究では、障害者乗馬における馬の有効的な利活用を目標に、生理学的評価から馬の特性を明らかにするための評価に関して、非侵襲的な新たな指標の検討を行い、障害者乗馬の分野に必要な知見を見出すことを目的とした。

第1章において、ストレス評価の新たな指標として涙液を用いた研究を行った。ストレス刺激は「視床下部-下垂体前葉-副腎皮質」へと伝わる「HPA系」と「視床下部-交感神経

「副腎髓質系」へと伝わる「SAM系」がある。これらが刺激されると、糖質コルチコイドやカテコールアミンが分泌される。これらの生理的ストレス反応を調べるために馬の頸静脈に穿刺し血液をサンプルとして利用することが多く見受けられるが、一方で穿刺によるストレスが存在する。そのため、穿刺による侵襲的な方法ではなく、非侵襲的な方法を工夫することが動物の生理的正常状態を把握するためにも重要である。

馬の涙液に関する研究において、眼病の検査のための方法としてコルチゾールを測定した報告があるが、採取に課題があることや投薬によって意図的にその濃度を变化させた研究であった。また、老齢馬と若齢馬では涙液の分泌に差があったとの報告もある。しかし、これらの研究は病理目的であり、ストレス指標としての生理学的な研究は行われていない。そこで、運動によるストレス負荷をかけた前後での涙液ならびに血漿中コルチゾール濃度の変化を測定した。

比較には、健康な8頭の馬を用いた。採涙および採血は、PreとPostの安静時に行い、蹄洗場に係留して行った。採血は採涙中に行い、それぞれの採取に伴うタイムラグを最大限考慮した。Postでは運動後5分採取した。

コルチゾールの解析には、EQUINE CORTISOL ELISA TEST KIT (Endocrine Technologies Inc., U.S.A)を用いた。冷凍保存した血漿は解凍し、100 μ L用いた。涙液はデュプリケートを優先するために50 μ L用いて、希釈せずに測定に用いた。

馬の心拍は心拍計ホルターPOLAR RS800 (Polar® Electro Oy, Kempele, Finland)を用いて測定した。心拍計を馬の胴胸部に巻き、無口頭絡の顎に受信機を取り付けて計測した。

実験は、Preの安静時5分、運動20分、Post安静5分間の計30分間行った。運動は、安静時の心拍(20~40bpm)に対して、3倍の運動強度の心拍120bpm以上になるよう、速歩および駆歩での調馬策運動を20分間行った。得られたデータの解析には、運動前後間のコルチゾール濃度の比較には関連二群t検定を用い、血漿中コルチゾール濃度と涙液中コルチゾール濃度の関係はスピアマンの順位相関係数検定によって統計処理を行った。

心拍数の解析には、外れ値や計測不能のデータを除き関連二群 t 検定を用いて運動前と運動中の値の比較を行った。

解析の結果、血漿 (n = 36, 34.53 ± 16.98 ng/ mL) および涙液 (n = 36, 17.97 ± 6.72 ng/ mL) からコルチゾールが検出された。得られた濃度をもとに、スピアマンの相関係数によって検定を行った結果、血漿中コルチゾール濃度に対して、涙液中コルチゾール濃度は有意な正の相関を示した (rs = 0.5, P < 0.01)。心拍数の変化は、運動前 (31.71 ± 10.73 bpm) に対して、運動中 (150.71 ± 22.44 bpm) が有意に高い結果となり、目的とした運動強度を満たした。運動の前後での変化を関連二群 t 検定によって比較を行った結果、血漿中および涙液中コルチゾールの値に有意な変化は得られなかった。

涙液中コルチゾール濃度と血漿中コルチゾール濃度との間に、有意な正の相関が得られたことから、涙液中のコルチゾールによりストレスの評価が可能であると考えられた。運動前後の変化に関して、涙液、血漿ともに有意な変化は得られなかったことから、このレベルの運動では「ストレス」をもたらすほどのものではないことが示唆された。これは、調馬策運動が日ごろからおこなわれている基礎調教であること、騎乗に比べると物理的負荷が少なかったことが影響していると推察した。運動内容による反応の違いとして、騎乗による運動と障害者乗馬の活動では、コルチゾール値の変化に有意な違いはなかったという報告もある。しかし、ストレッサーの強度と期間によってはコルチゾールの動態は変化することが予想されていることから、障害者乗馬などにおいて、ストレスの度合いを知るためにコルチゾールなどを評価することは重要である。

本研究から、涙液中のコルチゾール濃度の信頼性は高いことが示された。これにより、馬の生理的パラメータに関して、より非侵襲的な採取と馬への負担を減らすことにより、適正な評価が可能となる。

第 2 章において、馬の血漿中ならびに涙液中の神経伝達物質の測定を行った。ストレス指標として使われている物質には前述のコルチゾールのほかに、ノルアドレナリン、アド

レナリンおよびドーパミン（総称としてカテコールアミン）などの伝達物質がある。また、これにセロトニンを加えたモノアミンは様々な感情や行動の解析に重要な物質であるとも言われている。馬における神経伝達物質の測定は、運動強度や疾患による生理的変化を調べるために用いられているが、血液採取に「痛み」を伴う。前章で用いた涙液をサンプルとすることで、これまでの侵襲的なサンプリングと比較してより即時的な評価が可能であると考えた。

そこで、第1章と同様に採取した涙液を用いてカテコールアミンとセロトニンの測定を行い血漿中ならびに涙液中の変化を解析した。

第1章と同様に採取した血漿ならびに涙液を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）によって分離、測定した。血漿の処理には、アルミナを用いた抽出を行うことで血漿中の夾雑物を取り除いた。涙液も同様の手順でアルミナによる抽出で行った。

測定は HPLC（HTEC-500, EiCOM, 京都）を用いた。カテコールアミンの測定に使用した検出カラムは EICOMPAK CA-50DS（φ 2.1mm×150mm）を、プレカラムは PREPAK（φ 3.0mm, id. ×4mm）を用いた。設定温度は 25℃とし、加電圧は 450mA、移動相の組成は 700mg/L 1-オクタスルホン酸ナトリウムおよび 50mg/L EDTA・2Na を含むリン酸塩緩衝液（pH5.7）とし、メタノールは 12%とした。解析時間は流速 230 μL/mim で 30 分、100 μL/mim では 90 分とした。セロトニンの測定には EICOMPAK SC-50DS（φ 3.0mm, id. ×150mm）を、プレカラムは PREPAK（φ 3.0mm×4mm）を用いた。設定温度は 25℃とし、加電圧は 750mA、移動相は 0.1M 酢酸・クエン酸バッファーとし、メタノールは 17%とした。解析時間は流速 500 μL/min で 30 分とした。

解析の結果、血液中カテコールアミンの平均濃度は、ノルアドレナリン 451.36（±203.88）pg/mL、アドレナリン 187.37（±291.32）、ドーパミン 351.37（±124.11）pg/mL であった。出した涙液中の濃度平均は、それぞれノルアドレナリン 93.87（±174.56）pg/mL、アドレナリン 162.47（±399.62）pg/mL、ドーパミン 357.36（±156.67）pg/mL であった。スピアマンの順位相関係数検定の結果、ノルアドレナリン、ア

ドレナリン、およびドーパミンの相関係数はそれぞれ 0.4 ($P < 0.01$), 0.6 ($P < 0.01$), および 0.4 ($P < 0.01$) であった。対応のある t 検定を用いて運動前後間の比較を行ったが、血液中と涙液中のカテコールアミンにおける各物質の濃度に有意な変化は見られなかった。

一方、セロトニンはアルミナへは吸着せず、同様のアルミナ抽出法ができないことから、涙液の処理には、膜口径 0.02 のフィルターを用いて除タンパク処理をし、0.5mol/L 酢酸によって希釈し、これをサンプルとした。検出された濃度は 2109.64 (± 1362.31) pg/mL であった。運動前後間の比較において、統計的な有意差は得られなかった。

カテコールアミンにおける血漿中濃度と涙液中の濃度の強い相関は、涙液による生理的変化を評価するうえで有用であることが示された。涙液による神経伝達物質の測定は本研究が最初であり、非侵襲的かつ即時的な評価が可能となったことは大きな成果であった。また、単離ストレスを与えた馬は、コルチゾールの変化はなかったものの、血漿カテコールアミンの濃度を上昇させるといった報告もあり、内的な詳細な変化を評価するうえでカテコールアミンの濃度変化は重要であると考えられる。セロトニンは運動前後によって、検出される個体と検出が難しい個体があったことや、活動によっても変化があることから、セロトニンと馬の個体には何らかの関係性があると考えられる。

第 3 章では、オキシトシンの測定を行った。オキシトシンは母子関係や他者への思いやり、ストレスの緩和などに関係があるとされている。また、近年では人と犬との関係においても重要な物質であることが判明しつつある。人と犬のオキシトシンには正の相関が得られるが、オオカミと人との間ではこの関係が成り立たないことが報告されている。

しかし、人との活動における馬のオキシトシンはまだ明らかにされていない。そこで 3 章では、涙液からオキシトシンを測定することと、その変化に関して実験を行った。さらにオキシトシン、コルチゾール、ドーパミンなど情動に関わる 3 つの物質も同様に解析を

を行い、それらの関係を調べた。また、飼育者やインストラクターに対する馬の気質評価を行い、生理的変化との関係を検討した。

使用した馬は健康な 17 頭を用い、前章と同様に涙液を採取した。測定は、Oxytocin Enzyme Immunoassay Kit (ARBOR ASSAYS, Inc. USA) を用いて行った。

また、ストレス評価として、コルチゾールを第 1 章と同様に、ドーパミンの測定は第 2 章と同様にカテコールアミンの測定条件で行った。サンプルの採取は運動前後に行った。運動条件は、通常の乗馬や曳馬による活動とし、最長 40 分間とした。

飼育者およびインストラクターによるアンケート調査は各施設で飼育・調教に携わる者に依頼した。項目は「茶目っ気」「好奇心」「友好的」「神経質」「興奮性」「頑固」「愛着」「理解力」とした。

また、回答者が個体を使う頻度や個体の特徴、活動に選択する際のポイントを自由記述によって回答を求めた。得られた回答とオキシトシンおよびコルチゾール、ドーパミンとの関係性を求めた。

涙液の解析の結果、涙液中から検出されたオキシトシンの平均濃度 (±SD) は 81.96 (±68.04) pg/mL であった。得られたデータから運動前後を対応のある t 検定を用いて比較した結果、統計的な有意差は得られなかった。しかし、馬の個体毎に検定を行った結果、オキシトシン濃度に差があることが分かった。また、オキシトシンの濃度が前後で上昇する個体と下降する個体があり、明らかに個体による違いがあった。この個体差には年齢や性別は関係がなかった。コルチゾールの平均濃度 (±SD) (1.30 (±1.76pg/mL)) やドーパミンの平均濃度 (±SD) (132.52 (±108.94 pg/mL)) の変化においても、同様の結果が得られた。

アンケートの結果、全項目の平均は 3.0 (±0.9) 点であった。各項目において「茶目っ気」は 3.1 点 (±0.8), 「好奇心」は 3.1 点 (±0.8), 「友好的」は 3.4 点 (±0.5), 「神経質」は 2.7 点 (±1.0), 「興奮性」は 2.5 点 (±0.8), 「頑固」は 3.1 点 (±1.0), 「愛着」は 2.6 点 (±0.9), 「理解力」は 3.7 点 (±0.8) であった。

項目間の比較を一元配置分散分析および Tukey-Kramer 法を用いて比較を行った。「理解力」に対して「興奮性」と「愛着」が有意に低く ($P < 0.01$), 次いで「神経質」が有意に低かった ($P < 0.05$)。その他の項目間での統計的な有意差は得られなかった。これらの項目に対して、年齢との関係性は得られなかった。

これらのことから、個体ごとに人との関係が異なる可能性がある。また、馬が強い運動や得意ではないことをインストラクターが要求したときに、オキシトシンやドーパミンは明らかに減少していた。第 3 章から、馬の個別の特性を評価するにはオキシトシンやドーパミン、コルチゾールの測定が特に重要であると思われた。

馬のトレーニングにおいて、 β エンドルフィンの濃度が変化したとの報告もあり、オキシトシンやドーパミンに関しても同様のことが起こっていた可能性が高い。つまり、トレーニングの度合いを考える指標になりうる。馬自身の潜在的な「やる気」は、インストラクターや騎乗者、トレーニングによって変化し、この馬のやる気と人との活動のマッチングが障害者乗馬や馬事介在活動の良い効果につながると考えられる。

トレーニングの方法によって馬の愛着（不安と回避）に差が生まれることが報告されている。トレーニングによって馬が人に対してより愛着をもつのか、馬の素質として愛着が高かったのかなど、オキシトシンやドーパミンが馬と人との関わりにおいて重要な指標となると思われる。

また、馬の飼育者やインストラクターによる馬の気質評価に関して、「理解力」についての得点が高く、「興奮性」「神経質」が低かったことは、日ごろの調教を重視しているためと考えられる。また自由記述においても、安心や安定といったワードが多かったことから馬の「理解力」は重要視され、「興奮性」や「神経質」は低くするべき、あるいは素質として低い個体であることが重要であると考えられる。一方、「愛着」が低かったことは、ホースセラピーや馬介在活動において用いられる馬は、特定の人に対する「愛着」よりも、誰にでも同様の「愛着」を重要視されると考えられる。

第4章では、涙液の有用性と馬の適性に関して考察し、総括した。

本研究は、涙液中には血漿とほぼ同様の成分が含まれており、生理的変化の指標として十分に活用が可能であることを明らかとした。涙液にはストレス指標となるコルチゾール、ノルアドレナリン、アドレナリンのほか、人との親和性の度合いを示すオキシトシンも存在する。現状では血液中のセロトニンを測定するのは簡単ではない。しかし、涙液はほぼ原液のまま HPLC で測定できセロトニン、ドーパミンの存在も明らかとなった。

採取のストレスを減らすことは、馬の生理的変化をとらえるためには欠かせない。また、神経伝達物質やホルモンなどの測定により、心拍変動だけでは測れなかった心理状態や生理的変化を、より客観的に評価することが可能になった。

人と動物の相互作用に関して、犬と人との関係に関しては多くの報告がある。特に人と犬におけるオキシトシンは重要である。オキシトシンは、犬も人と同様の変化があると報告されており、また活動前後における唾液中コルチゾールが有意に低下したとの報告もある。これらの物質は動物種が異なっても、生体内では同様の内的変化が起こっている可能性は高い。しかし、犬と同様に介在活動や介在療法に用いられる馬の知見は犬に比べるときわめて少ない。

本研究において、涙液中に含まれたオキシトシンの濃度に個体差がみられた。また、オキシトシンとドーパミンのレベルに正の相関が得られた。つまり、ドーパミンにも個体差があることが示された。

ドーパミンは学習や運動機能、性機能、向上心などに関係し、達成感による快楽を得ることでさらなる意欲をもたらす。ドーパミンが低下すると、物事への関心が低下する。これらのことから、馬の潜在的なやる気には個体差があり、おそらくドーパミンレベルが高い馬の方がよりやる気があることが推察される。インストラクターや騎乗者、トレーニングによってさまざまに変化し、この馬のやる気と人との活動のマッチングが重要であることが強く示唆された。

セロトニンは精神を安定させ、幸福感を生み出すホルモンとしてアドレナリンとドーパミンがバランスよく働くようコントロールする働きを担っている。セロトニンが不足すると疲れやすく意欲がなくなる。セロトニンが検出された馬のなかで、神経質といわれた馬は、活動後にセロトニンが減少していた。他の馬においては、運動前後での変化はなかったことから、負の精神状況である馬に適切なアプローチを行う手がかりになると思われる。

また、トレーニングの方法によって馬の愛着（不安と回避）には差が生まれることが報告されている。トレーニングによって馬が人に対してより愛着をもつのか、馬の素質として愛着が高かったのか、オキシトシンのレベルで評価が可能となった。

アンケートの結果から、飼育者やインストラクターによる馬の適性として重要なのは「理解力」であり、「興奮性」や「神経質」は低くするべき、あるいは素質として低い個体であることが重要と考えられる。また「理解力」や「興奮性」「神経質」はトレーニングや日々の飼育管理によって変化すると考えられる。

本研究は障害者乗馬に用いる馬の特性評価に有益であり、またこれまでの主観的な評価によって選択されてきた人と馬のマッチングをより科学的な方法で行えることを明らかにした。

Summary

Characterization and Adaptation of Horses for Handicapped People

Maho Fuchikami

Department of Human and Animal-Plant Relationships Graduate School of Agriculture
Tokyo University of Agriculture

Introduction

Relatively few studies have evaluated the effects of riding programs for disabled individuals on the horses themselves, when compared to the number of studies focused on the effects of such programs on disabled riders. Furthermore, some studies have reported that horses and humans exhibit different stress responses, whereas other studies have reported that the stress of horses used by able-bodied and handicapped people are similar.

Instructors generally select horses based on the horses' height, weight, or degree of training or on the physiques of side walkers and riders generally select horses of ~12 years in age. However, there is no scientific basis for these evaluations or choices, and they are described empirically.

Both subjective assessment, such as observing and listening, and objective physiological evaluation have been used to research stress. During physiological evaluations, blood or other fluids are used to measure the levels of hormones and neurotransmitters secreted in response to stress. However, samples must be collected

frequently for such evaluations, a non-invasive sampling method that causes little stress to the animals is necessary. Accordingly, researchers often use heart rate, but we must consider that these are side reactions. Meanwhile, urine and faeces are difficult to collect, and the post-collection treatment of saliva is a complicated process.

The aim of the present study was to establish new non-invasive that could be used to physiologically evaluate horses and to elucidate the stress of disabled-oriented riding programs on horses.

Chapter 1: Measurement of Cortisol in Horse Tears

Both the hypothalamus-sympathetic-adrenal medulla (SAM) and hypothalamic-pituitary anterior-adrenal cortex (HPA) systems are involved in stress responses. When these systems are stimulated, chemical substances, like catecholamines and carbohydrate corticosteroids, are released. Although researchers often extract blood from the jugular veins of horses to examine these physiological stress reactions, it is likely that the extraction procedure itself would cause some degree of stress. Therefore, it is important to establish a non-invasive method for measuring the normal physiological state of animals.

Previous studies have used the cortisol levels of tears to inspect eyes but reported that tears were difficult to collect, and it was a research that intentionally changed the concentration by the medication. Another study reported a difference in the secretion of tears by old and young horses. However, these studies were focused on pathology, not physiology. Therefore, the present study investigated the effects of training stress on the cortisol levels of tears and plasma of eight healthy horses.

Tears and blood were simultaneously sampled before (Pre) and after (Post) exercise training, and the time lag of tear sampling with each collection was minimized.

Post sampling was moored and collected immediately after exercise training.

An EQUINE CORTISOL ELISA TEST KIT (Endocrine Technologies Inc., USA) was used to measure cortisol levels. Frozen plasma samples were thawed, and 100 μ L undiluted was used, using 50 μ L to prioritize the duplicate.

Heart rate was measured using a heart rate halter polar RS800 (Polar Electro Öy, Kempele, Finland). The heart rate sensor was wound up in the chest of horse, and the receiver was attached to the jaw of the oral cavity.

The experiment lasted 30 min, including an initial 5-min rest period, 20-min exercise period, and 5-min post-exercise rest period. The exercise was 20 min long movement at the pace and the ejection step, so that the resting heart rate (20-40 bpm) was increased to >120 bpm. The relationship between the cortisol levels of the plasma and tears using the Spearman test correlation coefficient, and the Pre and Post cortisol levels were compared by using a paired t-test.

The cortisol levels in the plasma ($n = 36$, 34.53 ± 16.98 ng/mL) and tear samples ($n = 36$, 17.97 ± 6.72 ng/mL) were positively correlated ($r_s = 0.5$, $P < 0.01$), and heart rate was significantly higher after exercise (150.71 ± 22.44 bpm) than before (31.71 ± 10.73 bpm). However, exercise failed to affect the cortisol levels of either the plasma or tear samples (paired t-test).

Because the plasma and tear cortisol concentrations were positively correlated, it was possible to evaluate stress using tear cortisol levels, and because exercise had no effect on cortisol levels, it is likely that the daily Longe plan movement, rather than exercise intensity, is what differs among riding events. In any case, measuring cortisol is valuable for assessing stress, especially that from riding by the disabled, since cortisol levels may be affected by the strength and duration of riding.

The present study demonstrates that tear cortisol levels can be used as a less-

invasive method for reliably evaluating the stress of horses.

Chapter II: Measurement of Neurotransmitters in Horse Tears

In addition to cortisol, stress can also be evaluated using neurotransmitters, such as noradrenaline, adrenaline, and dopamine (i.e., catecholamine). The monoamine serotonin is a neurotransmitter that is important for analysing feelings and behaviours. In horses, neurotransmitters are measured in order to assess the physiological changes caused by motor strength and disease, but the collection of blood can cause pain for the animals. Tears, in contrast, can be sampled without causing pain, thereby allowing more rapid physiological evaluation.

Tear and plasma samples were collected as in Chapter 1 and subject to high-performance liquid chromatography (HPLC). Plasma and tears catecholamine were extracted using alumina.

Catecholamine was measured using HPLC (Htec-500, EiCOM, Kyoto) with a Eicompak CA-50DS (ϕ 2.1 mm \times 150 mm) detection column and pre-column (ϕ 3.0 mm, ID. \times 4mm). The setting temperature was 25 °C, and the voltage was 450 mV. The mobile phase was a phosphate buffer that contained sodium 1-isophthalic acid (700 mg/L), EDTA-2na (50 mg/L, pH 5.7), and methanol (12%). The analysis time was 30 min at 230 μ L/min, and 90 min at 100 μ L/min. Serotonin was separated and measured using a Eicompak SC-500D (ϕ 3.0 mm \times 150 mm) detection column and Prepak (ϕ 3.0 mm \times 4mm) pre-column. The setting temperature was 25 °C, and the overvoltage was 750 mV. The mobile phase was a 0.1 M acetic acid-citric acid buffer, with methanol (17%). The analysis time was 30 min at 500 μ L/min.

The average blood concentrations of noradrenaline, adrenaline, and dopamine were 451.36 pg/mL (\pm 203.88, SD), 187.37 (\pm 291.32), and 351.37 pg/mL (\pm 124.11),

respectively, whereas the average tear concentrations were 93.87 pg/mL (\pm 174.56), 162.47 pg/mL (\pm 399.62), and 357.36 pg/mL (\pm 156.67). The Spearman test correlation coefficients for noradrenaline, adrenaline, and dopamine were 0.4 ($P < 0.01$), 0.6 ($P < 0.01$), and 0.4 ($P < 0.01$), respectively. Exercise did not have a significant effect on the catecholamine levels of either blood or tears (paired t-test).

Because serotonin is abundant in platelets and is not adsorbed to alumina, it is difficult to measure in blood. However, it was easy to filter tears (0.2 μ m, W-MO, CENTRICUT, CURABO, Osaka) for deproteinization. The tears were diluted using 0.5 mol/L acetic acid. The detected concentration was 2.11 ng/mL (\pm 1.36). Exercise did not have a significant effect on serotonin levels.

The strong correlation between the catecholamine levels of plasma and tears was useful for assessing physiological changes in horses. The detection of neurotransmitters in tears is a significant achievement and represents a valuable non-invasive method for rapidly evaluating physiological changes. Catecholamine concentrations are considered important for evaluating internal changes. Because serotonin levels vary greatly among individual horses, serotonin was not detected in samples from some of the horses.

Chapter III: Measurement of Oxytocin in Horse Tears and Relationship Between Oxytocin and Dopamine

Oxytocin is involved in mother-child relationships, compassion for others, and relaxation. Recently, oxytocin has also been implicated in human-dog relationships; there is a positive correlation between the oxytocin of people and dogs but no relationship between wolves and people. However, the relationship between horse oxytocin and human activity has yet to be reported. The aim of this study was to measure oxytocin,

cortisol, and dopamine in the tears of horses, to evaluate the temperament of horses by breeders and instructors, and to examine the relationship with physiological changes.

The horses used were healthy 17-heads, and tear samples were taken as described in previous chapters. Oxytocin was measured using an Oxytocin Enzyme Immunoassay Kit (ARBOR ASSAYS, USA), and dopamine levels were measured as described in Chapter II. Tear samples were collected before and after the exercise, which consisted of ≤ 40 -min riding sessions that included typical levels of walking, trotting, and cantering. The questionnaire survey by breeders and instructors involved in rearing and training at each facility. The items were "mischievous", "curiosity", "friendly", "nervous", "excitable", "stubborn", "attachment", and "understanding power". The survey responses were analysed in relation to the oxytocin, cortisol, and dopamine levels.

Exercise did not have a significant effect on tear oxytocin levels (81.96 ± 68.04 pg/mL). However, there were differences in the oxytocin levels of the individual horses, and exercise clearly affected the oxytocin levels of the individuals. Age and sex were not accurate predictors of individual differences. Similar results were obtained for cortisol (1.65 ± 0.02 μ g/dL) and dopamine (132.52 ± 108.94 pg/mL).

As a result of the questionnaire, the average of all items was 3.0 (± 0.9) points. In each item, "mischievous" was 3.1 points (± 0.8), "curiosity" was 3.1 points (± 0.8), "friendly" was 3.4 points (± 0.5), "nervous" was 2.7 points (± 1.0), "excitability" was 2.5 points (± 0.8), "stubborn" was 3.1 points (± 1.0), "attachment" was 2.6 points (± 0.9), and "comprehension" was 3.7 points (± 0.8). The items were compared using a single-position distributed analysis and the Tukey-Kramer method. "Excitability" and "attachment" were significantly lower ($p < 0.01$), and also "nervous" was significantly low ($P < 0.05$), compared with "comprehension". There were no significant differences between the other items. The significant relationship with age was not obtained for these items.

These results suggest that the relationship with people was different for each individual horse. Moreover, oxytocin and dopamine were clearly lower when instructors reported that a horse was not agreeable. We conclude that the measurement of oxytocin, dopamine, and cortisol are important for evaluating individual horses.

A previous horse-training study reported that the concentration of β -endorphin had changed, which suggests that the same thing happens with oxytocin and dopamine. In other words, it could be an index to think about the degree of training. The potential "motivation" of horses might depend on instructor, rider, and training, and the willingness of each horse to match the activity with the person should be considered to get a good effect of riding and horse-intervening activities for persons with disabilities.

One study reported that training method affects the attachment of horses. Thus, oxytocin and dopamine are important indices for the relationships of horses and people.

Moreover, the "understanding power" score was high, and the "excitability" and "nervous" scores were low. The free description suggested that the horse's "understanding power" might be important, owing to the sure of words like "security" and "stability". On the other hand, the low "attachment" score might indicate that the horses used for horse-assisted therapy and activities are more important than "attachment" to any particular person.

Chapter IV: Conclusions

We discussed and summarized the usefulness of tears for physiological evaluation. Tears contained nearly the same components as plasma, and it was possible to use them as indicators of the physiological condition of horses. More specifically tear levels of cortisol, noradrenaline, and adrenaline are useful as stress indices, whereas tear levels of oxytocin indicate the degree of affinity with people, and tear levels of

dopamine indicate the degree of motivation. At present, it is difficult to measure blood levels of serotonin, but it was easy to measure tear levels of serotonin. Serotonin is responsible for stabilizing the mind and controlling adrenaline and dopamine levels.

The reduction of stress during sample collection is indispensable for assessing the physiological states of horses. Almost all animals used for animal-mediated therapy and activity are dogs because it was able to know the essence of dogs. There are a lot of reports about the interaction between dogs and people.

The present study demonstrates that, by using tears, it is possible to determine the essence of a horse. There was a positive correlation between oxytocin and dopamine levels. When selecting a horse for riding, it would be highly useful to know tear levels of oxytocin or dopamine. This research is revolutionary.

謝 辞

本研究を進めるにあたり、終始温かなご指導とご鞭撻をいただいた東京農業大学農学部バイオセラピー学科動物介在療法学研究室の太田光明教授に謹んで深謝いたします。また、研究全般にわたり終始懇切丁寧なご指導とご鞭撻をいただきました本学、増田浩司教授、川嶋舟准教授、内山秀彦准教授に深く感謝いたします。

東京農業大学の多くの教員の皆様には、研究についてご指導、ご助言を賜りましたこと、深くお礼申し上げます。

また供試馬を提供いただきました東京農業大学農学部バイオセラピーセンターの横山直様、木本直希様、鈴木正友喜様には多大なるご理解、ご協力をいただき感謝申し上げます。

麻布大学獣医学部動物応用科学科 大谷伸代講師、介在動物学研究室の学生の皆様、帝京科学大学うまセンター 喜久村淑徳特任助手におきましても供試馬の提供、ご助言をいただき深く感謝申し上げます。

特定非営利活動法人障害者乗馬のための馬事普及協会 井原昌代様はじめ、職員の皆様、NPO 法人 EPO 高橋智様はじめ、職員の皆様には供試馬の提供を快諾いただき深く感謝申し上げます。

サンプル分析に関して、多くのご教示とご助言を賜りました株式会社 EiCOM の田部裕司様、脇博昭様はじめ、社員の皆様に心からお礼申し上げます。

研究を進めるにあたり、本学動物介在療法学研究室の皆様には多大なる協力をいただき励みとなりました。お礼申し上げます。

最後に、博士課程に進学する機会を与えて下さり、多くの場面で私を励まし見守り続けてくれた両親に深く感謝いたします。