

氏 名	瀧 上 真 帆
学位 (専攻分野の名称)	博 士 (バイオセラピー学)
学 位 記 番 号	甲 第 761 号
学位授与の日付	平成 30 年 3 月 21 日
学 位 論 文 題 目	<b>障害者乗馬に用いる馬の特性評価と適性に関する研究</b>
論 文 審 査 委 員	主査 教 授・農 学 博 士 太 田 光 明 教 授・博士 (獣医学) 増 田 宏 司 准 教 授・博士 (獣医学) 川 嶋 舟 准 教 授・博士 (学術) 内 山 秀 彦

## 論文内容の要旨

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。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

腎髄質系」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変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。採涙及び採血は、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では運動後直ちに係留し採取した。

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 $\mu$ l用いた。涙液はデュプリケートを優先するために50 $\mu$ 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。心拍計を馬の胸部部に巻き、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 ( $n = 36$ ,  $34.53 \pm 16.98 \text{ ng/ml}$ ) 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 ( $r_s = 0.5$ ,  $P < 0.01$ )。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。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、過電圧は 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 μ l/mim で 30分, 100 μ l/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、過電圧は 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  $500 \mu\text{l}/\text{min}$  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  $451.36 \text{ pg/ml}$  ( $\pm 203.88$ , SD), アドレナリン  $187.37$  ( $\pm 291.32$ ), ドーパミン  $351.37 \text{ pg/ml}$  ( $\pm 124.11$ ) 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  $93.87 \text{ pg/ml}$  ( $\pm 174.56$ ), アドレナリン  $162.47 \text{ pg/ml}$  ( $\pm 399.62$ ), ドーパミン  $357.36 \text{ pg/ml}$  ( $\pm 156.67$ ) 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  $0.4$  ( $P < 0.01$ ),  $0.6$  ( $P < 0.01$ ), 及び  $0.4$  ( $P < 0.01$ ) 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、 $0.5 \text{ mol/L}$  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  $2109.64 \text{ pg/ml}$  ( $\pm 1362.31$ ) 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と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行い、それらの関係を調べた。

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 分間にした。

その結果、涙液中からオキシトシンが検出され ( 81.9pg/ml (±7.85) ), 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 (1.65pg/ml (±0.20) ) やドーパミン (240.40pg/ml (±100.50) ) の変化においても、同様の結果が得られた。

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。

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变化を、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

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。

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と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。

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。

## 審査報告概要

本研究は、障害者乗馬に用いる馬の特性評価と適性に関して、従来の主観的なものから客観的な指標で行えるようより適切なサンプルを用いる独自性を示した。馬は草食動物であり、多くの捕食者から逃れるため、臆病なところがある。そうした動物から短い時間内に複数回採血することは難しい。そこで、血液に代わるものとして涙液を用いた。採涙は採血のような痛みを与えることなく、無拘束で何度でもできる。この涙液中には、評価と適性の指標となるうるホルモン及び神経伝達物質（モノアミン）のいずれもが存在し、それらの濃度は血液と正の相関を示した。涙液中のモノアミンを同定したのみならず、人との愛着度を示すオ

キシトシンを初めて同定し、涙液ドーパミン変化と相関したことはまさに新発見であった。また、ストレスホルモンであるコルチゾールやオキシトシンなどから、障害者乗馬に用いる馬を選択できるとした。これらの研究成果等を詳細に検討した結果、審査委員一同は博士(バイオセラピー学)の学位を授与する価値があると判断した。